

Der Einfluss cholinergischer Stimulation auf die Herzfunktion der Ratte im Rahmen einer endotoxämischen Kardiomyopathie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Astrid Schulte

aus Siegen

Gießen 2014

Aus dem medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie

Klinik für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Gutachter: Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Kummer

Tag der Disputation: 27.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Sepsis.....	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Bedeutung und Inzidenz	3
1.1.3 Molekulare Mechanismen in der Pathogenese	4
1.2 Die septische Kardiomyopathie	8
1.2.1 Hämodynamik in der Sepsis	8
1.2.2 Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie	9
1.2.3 Beeinträchtigung der autonomen Herzregulation	11
1.3 Der Einfluss des Nervensystems auf die Inflamationsreaktion	12
1.3.1 Die Entdeckung des Acetylcholins	12
1.3.2 Das cholinerge System in nicht-neuronalen Zellen	13
1.3.3 Der cholinerge antiinflammatorische Reflex – Die Bedeutung des efferenten Nervus vagus	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material.....	18
2.1 Geräte	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Medikamente und Arzneimittel	21
2.4 Chemikalien und Lösungen	21
2.5 Komplettsysteme.....	22
2.6 TaqMan® Gene Expression Assays	22
2.7 Software	23
2.8 Versuchstiere.....	23

3	Methoden	24
3.1	Studiendesign und Versuchsablauf	24
3.2	Induktion der septischen Kardiomyopathie	26
3.3	Hämodynamik-Messungen mit dem Millar-Konduktanz-Katheter	26
3.4	Durchführung der Katheterversuche	29
3.4.1	Narkoseeinleitung und Intubation	30
3.4.2	Beatmung	31
3.4.3	Monitoring	31
3.4.4	Katheterisierung	32
3.4.5	Kalibrierung der Parallel-Konduktanz	35
3.4.6	Intravenöse Injektion von Physostigmin und Stimulation des <i>Nervus vagus</i>	36
3.4.7	Auswertung	37
3.5	Arbeiten mit RNA	38
3.5.1	Isolation RNA	38
3.5.2	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	39
3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.6.1	TaqMan [®] <i>Real-Time</i> PCR	40
3.7	Arbeiten mit Proteinen	42
3.7.1	Proteinisolation aus Herzgewebe	42
3.7.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	44
3.8	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Etablierung des Tiermodells	46
4.2	Überleben und Mortalität	48
4.3	Hämodynamik des Herzens	50
4.3.1	Hämodynamische Funktion der Ratte unter endotoxämischen Bedingungen	51
4.3.2	Hämodynamische Funktion endotoxämischer, vagotomierter Ratten unter elektrischer Stimulation des <i>Nervus vagus</i>	55
4.4	Molekularbiologische Ergebnisse	60
4.4.1	Proteinspiegel proinflammatorischer Zytokine im Plasma und kardialen Gewebe	60

4.4.2	Expression von TNF- α auf mRNA-Ebene	64
4.4.3	Acetylcholinsynthese im ventrikulären Gewebe (ChAT vs. CarAT)	65
5	Diskussion	67
5.1	Die erfolgreiche Etablierung eines LPS induzierten septischen Kardiomyopathiemodells unter Anwendung des Millar-Konduktanzkatheters in narkotisierten Ratten	68
5.2	Der Einfluss des <i>Nervus vagus</i> auf die Hämodynamik und die Immunreaktion	72
5.2.1	Der Verlust des vagalen Tonus führt zu einer massiven Störung der Hämodynamik und gesteigerten Zytokinspiegel im septischen Schock	73
5.2.2	Eine elektrische cholinerge Stimulation kann die Beeinträchtigung der Hämodynamik durch den Vagotomie-Effekt nur teilweise kompensieren	76
5.3	Das Herz als mögliches Bindeglied zwischen Immun- und Nervensystem - Hypothese zum cholinergen anti-inflammatorischen Reflex	79
5.4	Schlussfolgerungen	81
6	Zusammenfassung	82
7	Summary	83
	Abkürzungsverzeichnis	84
	Abbildungsverzeichnis	87
	Tabellenverzeichnis	89
	Literaturverzeichnis	90
	Publikationsverzeichnis	106
	Ehrenwörtliche Erklärung	107
	Danksagung	108
	Tabellarischer Lebenslauf	109

1 Einleitung

1.1 Die Sepsis

1.1.1 Definition

Das klinische Bild der Sepsis (griechisch: σήψις – „Fäulnis“) ist seit Hippokrates (um 360–470 v. Chr.) bekannt. Im Jahr 1914 beschrieb Hugo Schottmüller eine erste moderne Definition: *„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“* (Schottmüller 1914). Diese Definition wurde im Laufe der Zeit an das wachsende Verständnis der komplexen Zusammenhänge in der Sepsis angepasst. Nach heutiger Definition ist die Sepsis eine überschießende Reaktion des angeborenen Immunsystems, hervorgerufen durch eine Infektion mit Bakterien (bakteriell), deren Toxinen (Endo- und Exotoxinen), Pilzen (fungal) oder Viren (viral). Dem Wirt ist es dabei nicht möglich die inflammatorische Reaktion lokal einzuschränken. Daher geht die Sepsis mit einer Vielzahl von Funktionsstörungen im Organ-, Immun- und Gerinnungssystem einher. Hinter der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt stellt die Sepsis die dritthäufigste Todesursache dar.

Erst im Jahr 1992 wurde eine einheitliche und bis heute gebräuchliche Definition der Sepsis vom „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ (Bone et al. 1992; Levy et al. 2003) formuliert. Dabei stellt das **„Systemische inflammatorische Response-Syndrom“** (SIRS, engl.: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) ein Kriterium innerhalb dieser Festlegung dar und bezeichnet eine systemische inflammatorische Reaktion des Immunsystems auf ein auslösendes Ereignis (Trauma, Schock etc.; Abb. 1). Dazu müssen mindestens zwei der folgenden vier Kriterien erfüllt sein:

- Körpertemperatur: $> 38\text{ °C}$ (Hyperthermie) oder $< 36\text{ °C}$ (Hypothermie)
- Tachykardie mit einer Herzfrequenz $> 90\text{ /min}$

- Tachypnoe von mehr als 20 /min bzw. $p_a\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ($< 4,3 \text{ kPa}$)
- Leukozytose von mehr als 12.000 Zellen/ μl oder Leukozytopenie von weniger als 4000 Zellen/ μl oder $\geq 10 \%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild

Die **Sepsis** ist definiert als SIRS auf dem Boden einer nachgewiesenen oder klinisch sehr wahrscheinlichen Infektion (kurz: Sepsis = Infektion + SIRS, Abb. 1).

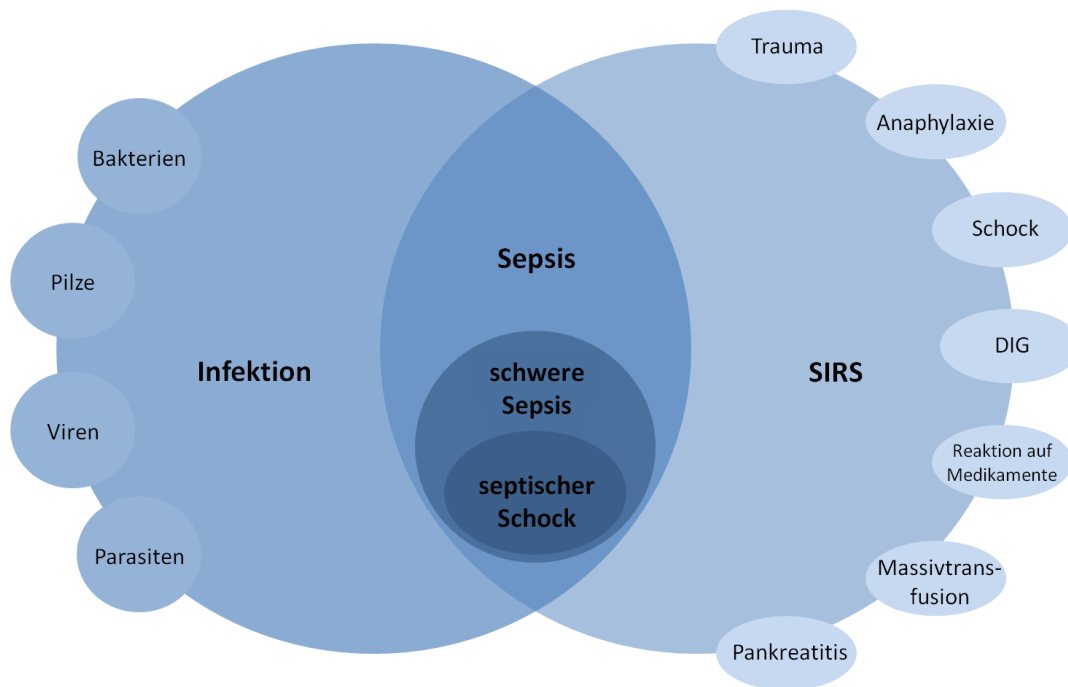


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Infektion, SIRS und Sepsis.

Die Sepsis wird definiert als eine Infektion, ausgelöst durch Bakterien, Pilze etc. und das Auftreten eines SIRS (systemische inflammatorische *Response*-Syndrom). Ein SIRS kann auch durch verschiedene nicht-infektiöse Ereignisse wie Trauma, Anaphylaxie, DIG (disseminierte intravasale Gerinnung) usw. hervorgerufen werden (modifiziert nach Bone et al. 1992).

Um eine **schwere Sepsis** handelt es sich, wenn zusätzlich zur Sepsis eine Organdysfunktion vorhanden ist (kurz: schwere Sepsis = Infektion + SIRS + Organdysfunktion). Zu den Organdysfunktionen zählen u. a. die akute Enzephalopathie sowie das Versagen von Nieren, Lunge, Leber und der Gerinnung, zudem eine metabolische Dekompensation mit Laktatazidose.

Ein **septischer Schock** liegt vor, wenn es zu einem Kreislaufversagen aufgrund der Sepsis kommt, welcher trotz adäquater Flüssigkeitstherapie mit einer arteriellen Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck $< 90 \text{ mmHg}$) bestehen bleibt und die Gabe von Vasopressoren notwendig macht (Levy et al. 2003).

1.1.2 Bedeutung und Inzidenz

In Deutschland erkrankten pro Jahr etwa 226 Personen pro 100.000 Einwohner (\cong 154.000 Fällen) an einer Sepsis, davon um die 110 Patienten an der schweren Sepsis und dem septischem Schock, was einer Fallzahl von ca. 75.000 entspricht (Brunkhorst 2006; Abb. 2). In den westlichen Industrienationen zusammengefasst liegt die Inzidenz der schweren Sepsis zwischen 50 – 120 Fällen pro 100.000 Einwohner (Moerer und Quintel 2009). Trotz intensiver Forschung und neuer Therapieoptionen sind die schwere Sepsis und der septische Schock mit einer Letalität von 20 - 50 % vergesellschaftet und stellen in der westlichen Welt die Haupttodesursache auf den meisten nichtkardiologischen Intensivstationen dar (Engel et al. 2007; Angus und van der Poll 2013). Der Tod tritt dabei durch das kontinierte Versagen verschiedener Organe ein (Multiorganversagen, MOV). Im Allgemeinen beeinflussen auch das Alter sowie das Geschlecht die Inzidenz der schweren Sepsis. Demnach sind Kinder und ältere Menschen sowie Männer häufiger betroffen als Personen anderer Altersklassen und Frauen (Angus et al. 2001). Daneben spielen aber auch die genetische Prädisposition und der allgemeine Gesundheitsstatus des Patienten eine wichtige Rolle (Angus und Wax 2001).

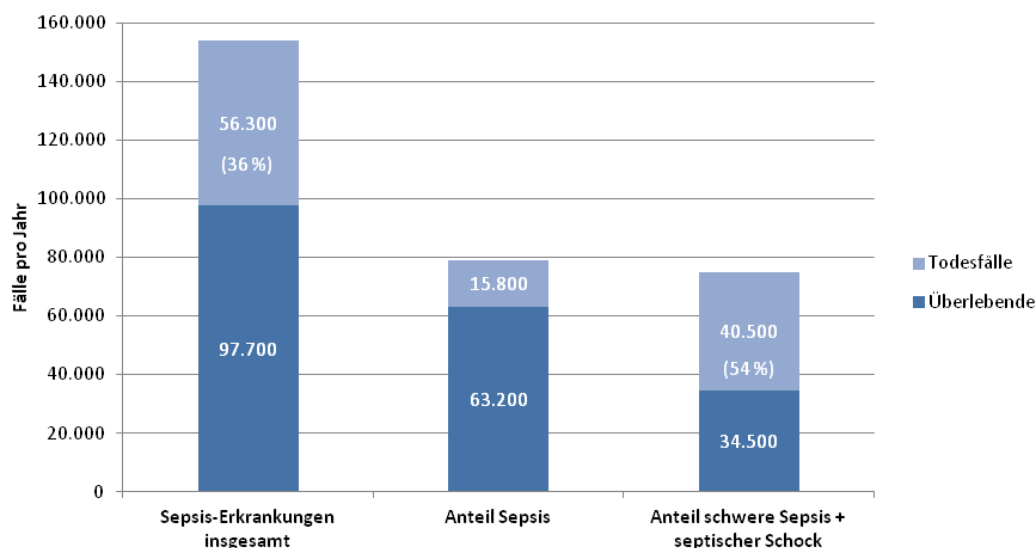


Abb. 2: Graphische Darstellung der Sepsis-Neuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2003. Im Auftrag der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI) mit Unterstützung des Kompetenznetzes Sepsis wurde im Zeitraum vom 15.01.2003 bis 14.01.2004 eine Beobachtungsstudie (SepNet-Studie) durchgeführt. Die ermittelten Fallzahlen basieren auf repräsentativen Stichproben (Brunkhorst 2006); Graphik verändert nach: Fachklinikum Brandis GmbH & Co. KG, Brandis.

In Deutschland liegt die Sterblichkeit insgesamt (Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock) bei etwa 36 %, wobei die Letalität mit dem Schweregrad der Sepsis zunimmt (Alberti et al. 2003). Demnach führt bei über der Hälfte der Patienten (54 %) die schwere Sepsis bzw. der septische Schock zum Tod (Brunkhorst 2006; Abb. 2).

1.1.3 Molekulare Mechanismen in der Pathogenese

In den meisten Fällen wird die Sepsis durch bakterielle Erreger hervorgerufen, dabei wurden 62 % der aus Intensivpatienten isolierten Bakterien als Gram-negativ und 47 % als Gram-positiv identifiziert, wohingegen Pilzinfektionen mit 19 % eine nachgeordnete Rolle als Verursacher der Sepsis einnehmen (Vincent et al. 2009). Untersuchungen auf deutschen Intensivstationen ergaben eine ausgewogene Verteilung der isolierten Bakterien (Gram-negativ: 54,1 % und Gram-positiv: 55,7 %; Engel et al. 2007). Nicht immer kann eine Infektion nachgewiesen werden, obwohl das klinische Bild des Patienten einer Sepsis entspricht. In einer internationalen Studie von 2007 konnte nur bei 51 % der Patienten Erreger isoliert werden (Vincent et al. 2009). Der häufigste primäre Infektionsort ist, in Übereinstimmung mit epidemiologischen Studien aus den USA und Europa, die Lunge (28 – 68 %), gefolgt von dem Abdomen mit 15 – 47 % (Brunkhorst 2006; Moerer und Quintel 2009).

Durch die Invasion pathogener Mikroorganismen kommt es zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, welches die erste Abwehrlinie des Organismus darstellt. Die Immunantwort wird vorwiegend durch neutrophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen vermittelt. Dabei spielen die sogenannten „*Pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs) eine wichtige Rolle. Bei ihnen handelt es sich um bestimmte für Mikroorganismen charakteristische Moleküle oder zelluläre Bestandteile, wie z. B. das Lipopolysaccharid (LPS; Abb. 3 B) Gram-negativer Bakterien, die Lipoteichonsäuren Gram-positiver Bakterien oder auch einzel- bzw. doppelsträngige RNA oder DNA (viralen Ursprungs), die von den als „*Pattern-Recognition Receptors*“ (PRRs) bezeichneten Rezeptoren gebunden werden. Die PRRs, zu denen unter anderem auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören, liegen sowohl intrazellulär als auch in membranständiger Form an der Zelloberfläche der Wirts- und Immunzellen (z. B. Makrophagen) vor (Takeuchi und Akira 2010). Nach dem Erkennen der PAMPs durch die PRRs wird die Transkription der Gene, die an einer inflam-

matorischen Reaktion beteiligt sind (z. B. proinflammatorische Zytokine), durch die Aktivierung einer Signalkaskade erhöht. Einer der bestbeschriebenen Vertreter der PPRs ist der TLR4, der zusammen mit MD 2 (*myeloid differentiation factor 2*) LPS erkennt. Das LPS muss zuvor einen Komplex mit dem LPS-binding Protein (LBP) bilden. Dieser Komplex wird dann von dem TLR4 assoziierten Corezeptor CD 14 (*Cluster of Differentiation 14*) erkannt. Die Signalkaskade wird aber erst durch die Homodimerisierung des TLR4/MD 2/LPS-Komplexes in Gang gesetzt (Park et al. 2009). Abhängig von den nachgeordneten Adapterproteinen können zwei Signalwege (Abb. 3 A) aktiviert werden, wobei der MyD88-abhängige (*myeloid differentiation factor 88*) als „früh“ und der MyD88-unabhängige Weg als „spät“ bezeichnet wird.

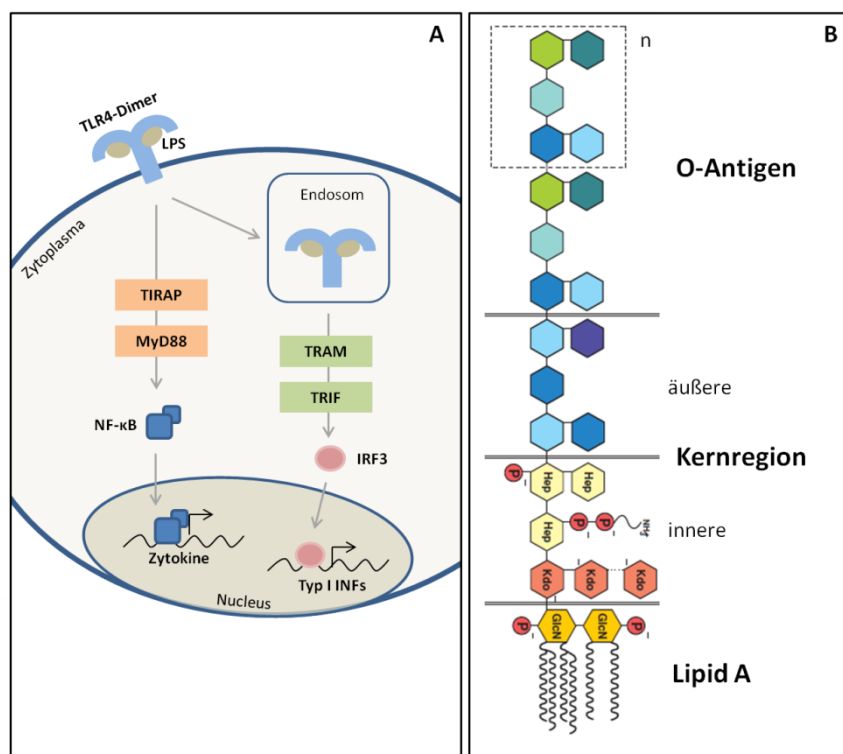


Abb.3: Der Signalweg von TLR4 ausgelöst durch seinen Liganden LPS. Die TLR4 Signalkaskade wird durch die Bindung des Liganden LPS ausgelöst. Die weitere Signalübertragung kann dann über zwei Pfade erfolgen, dem MyD88-abhängigen (A, links) und MyD88-unabhängigem Weg (A, rechts) über TRIF. Am Ende beider Kaskaden kommt es zu einer Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach Takeuchi und Akira 2010). Die schematische Struktur von LPS (B): Der Lipid-A-Teil ist in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien verankert und besteht aus einem biphosphorylierten Disaccharid aus Glucosamin (GlcN) und Fettsäuren. Dieser Teil wirkt als Endotoxin. An ihn gebunden ist der Polysaccharidanteil, aufgebaut in der inneren Kernregion aus den Zuckern 2-Keto-3-desoxy-octonat (Kdo) und Heptose (Hep) sowie Phosphatgruppen (P). Die äußere Kernregion besteht aus Hexosen. Das O-Antigen ist je nach Bakterienart verschieden und kann bis zu 50 (n) sich wiederholende Oligosaccharide enthalten (modifiziert nach Alexander und Rietschel 2001).

Ersterer induziert eine frühe Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), was zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine führt. Dagegen erfolgt die Signalweiterleitung des MyD88-unabhängigen Signalwegs nach Translokation in das Endosom über TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), wodurch es zu einer späten Aktivierung von NF- κ B kommt. Dies führt zu einer Synthese von Interferon β (INF- β) und INF-induzierten Genen (Salomao et al. 2012; Akira und Takeda 2004) und darüber hinaus auch zu der Produktion des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin 10 (Chang et al. 2007; Aksoy et al. 2012). Somit besteht durchaus ein Gleichgewicht zwischen der LPS-induzierten TLR4 vermittelten Expression pro- und antiinflammatorischer Mediatoren.

Neben den oben beschriebenen PAMPs können auch sogenannte „*Damage-associated molecular patterns*“ (DAMPs) von den Rezeptoren erkannt werden. DAMPs sind endogene Moleküle wie z. B. extrazelluläre RNA, DNA, Histone oder das „*high-mobility group protein 1*“ (HMBG1), die von beschädigten oder nekrotischen Zellen aktiv und passiv freigesetzt werden können. Sie sind ebenso wie die PAMPs in der Lage das Immunsystem zu aktivieren und können die Immunantwort, bei Infektion mit zusätzlicher Gewebeerletzung, weiter verstärken. Auch durch die bereits freigesetzten proinflammatorischen Zytokine, wie Interleukin 1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor α (TNF- α), kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgen. Dies führt zu einer weiteren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit zu einer potenzierten inflammatorischen Reaktion (Abraham 2003). Die großen in den Kreislauf gelangten Mengen an IL-1 und TNF- α induzieren so eine systemische Entzündungsreaktion, das SIRS (Weigand et al. 2004; Dinarello 1997). Bei der Sepsis kommt es also zu einer Überstimulation der Immunzellen mit einer daraus resultierenden Entgleisung des Immunsystems. Dabei führt die eigentlich nützliche Zytokinantwort, gedacht zur Vernichtung der eingefallenen Bakterien bzw. Inaktivierung ihrer Toxine, zu einer unangemessenen und schädlichen Entzündungsreaktion („Zytokinsturm“, Chong und Sriskandan 2011).

Erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel sind vor allem in der frühen Phase der Sepsis zu beobachten, danach folgt eine antiinflammatorische Gegenreaktion, das CARS („*compensatory anti-inflammatory response syndrome*“; Abb. 4). Zu diesem Zeitpunkt werden vermehrt antiinflammatorische Mediatoren (z. B. IL-4, IL-10) frei-

gesetzt. Dies kann bei dem Patienten zu einer Immunsuppression führen und macht ihn anfälliger für Sekundärinfektionen (Weigand et al. 2003; Hotchkiss et al. 2013).

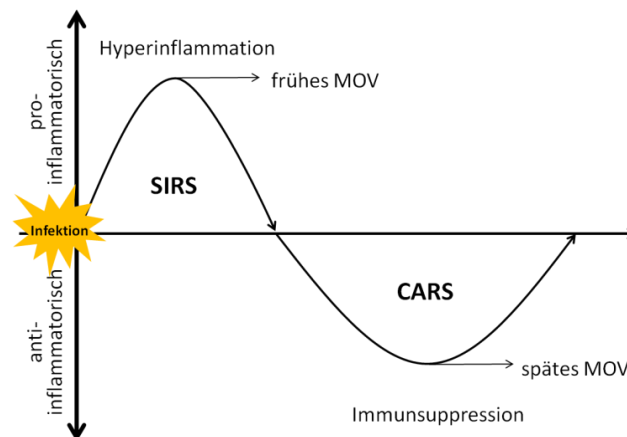


Abb. 4: Die Immunantwort während der Sepsis. Auf ein auslösendes Ereignis (z. B. Trauma, Infektion) folgt eine systemische proinflammatorische Reaktion des Immunsystems (SIRS). Schon während dieser Phase kann ein frühes Multiorganversagen (MOV) auftreten. Zumeist aber mündet das SIRS in einer kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktion (CARS). In dieser Phase sind die Patienten immunsupprimiert, so dass Sekundärinfektionen leichter auftreten und zu einem späten MOV führen können (modifiziert nach Mannick et al. 2001).

Diese Situation wird auch durch eine reduzierte Expression des „*human leucocyte antigen-DR*“ (HLA-DR) auf myeloiden Zellen widerspiegelt (Boomer 2011). In einer prospektiven Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass bei Lymphozyten aus akut septischen Patienten die Expression von Rezeptoren, die in Verbindung mit dem Phänomen der „*T-cell exhaustion*“ (Wherry 2011) stehen, hochreguliert sind (Boomer et al. 2012). Dies trägt vermutlich ebenso wie der Verlust der Fähigkeit zur Zytokinsekretion zu dem immunsupprimierten Status bei.

Auch die Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße besitzen immunologische Eigenschaften und können nach Stimulation durch die PAMPs eine proinflammatorische Signalkaskade auslösen. Dies führt zu einer Freisetzung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, wie dem „*Intercellular Adhesion Molecule 1*“ (ICAM 1) und dem „*vascular cell adhesion molecule 1*“ (VCAM 1), an die weitere Immunzellen binden können. Angeschlossen an diese Immunreaktion ist auch die Aktivierung des Gerinnungssystems, die durch das von den Endothel- und Immunzellen exprimierte prokoagulatorische Protein „*tissue factor*“ (TF) ausgelöst wird. Im Falle einer Sepsis ist die prokoagulatorische Antwort um ein Vielfaches verstärkt und führt zu einer Störung des Gerinnungssystems (Schouten et al. 2008). Dadurch und durch eine weitere

Aktivierung und Freisetzung auch nicht-zytokiner Mediatoren (z. B. Stickstoffmonoxid (NO) und der Plättchen aktivierender Faktor (PAF)) kommt es zu einer Beeinträchtigung der Mikro- und Makrozirkulation bis hin zur Perfusionsstörung der Organe (Lunge, Nieren, Darm, Leber und Herz). Die mangelnde Versorgung mit Sauerstoff und Substraten führt zu einer Gewebeschädigung und darüber hinaus zu einer Beeinträchtigung der Funktion dieser Organe (Abraham und Singer 2007; Nduka und Parrillo 2011). Bei einem Versagen von mehr als zwei Organsystemen spricht man von einem Multiorganversagen, das mit einer hohen Letalität verbunden ist (Hotchkiss und Karl 2003; Singh und Evans 2006).

1.2 Die septische Kardiomyopathie

1.2.1 Hämodynamik in der Sepsis

Im Zuge des multiplen Organversagens kommt es auch zu einer Störung der Herzfunktion. Diesem Umstand wurde lange Zeit keine größere Beachtung geschenkt, da die Herzfunktion eines septischen Patienten zumeist ein normales oder nur leicht erhöhtes Herzzeitvolumen (*Cardiac Output*) aufweist (Müller-Werdan et al. 2007). Wird jedoch die scheinbar gesunde Pumpfunktion in Beziehung zu dem massiv verminderten systemischen Gefäßwiderstand im septischen Schock gesetzt, ist das Ausmaß der Herzschildigung erkennbar (Abb. 5). Der reduzierte systemische Gefäßwiderstand ist auf die reaktive Gefäßschädigung von Arterien und Venen mit nachfolgender Vasodilatation zurückzuführen, so ist auch der meist stark erniedrigte Blutdruck der Sepsis-Patienten zu erklären.

Ein gesundes Herz kann die Nachlastsenkung durch eine deutliche Steigerung des Herzzeitvolumens (auf das Drei- bis Vierfache) anfangs kompensieren, dies wird jedoch nur bei 40 % der Patienten mit septischem Schock beobachtet (Ebelt et al. 2011). Die gestörte Herzfunktion während der Sepsis wurde erst in den 1980iger Jahren nachgewiesen (Parrillo 1989) und 1989 der Begriff „akute septische Kardiomyopathie“ von Schuster geprägt (Werdan 1989). In der offiziellen „Klassifikation der Kardiomyopathien“ (Elliott et al. 2008) ist die septische Kardiomyopathie jedoch nicht aufgeführt. Charakterisiert ist die septische Kardiomyopathie durch eine reduzierte Ejektionsfraktion, die mit einer Dilatation des linken Ventrikels verbunden

ist (Parrillo 1989). Im Falle des Überlebens normalisiert sich dieser Zustand innerhalb von etwa sieben bis zehn Tagen wieder weitestgehend und kann folglich als reversibel angesehen werden.

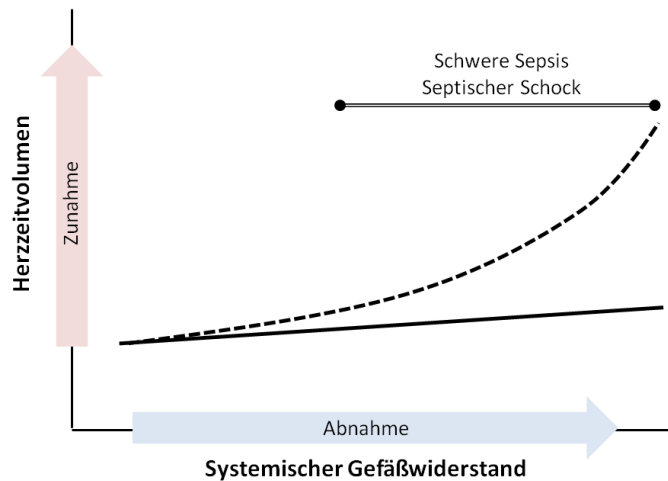


Abb. 5: Die Kardiodepression bei der schweren Sepsis und im septischen Schock. Um den normalen Blutdruck (um 90 mmHg) aufrechtzuerhalten, müsste das Herzzeitvolumen bei erniedrigtem systemischem Gefäßwiderstand um das Drei- bis Vierfache gesteigert sein (gestrichelte Linie). Bei den meisten Patienten liegen die tatsächlichen Werte (durchgezogene Linie) jedoch deutlich niedriger (modifiziert nach Müller-Werdan et al. 2007).

Man bezeichnet die Sepsis-assoziierte Myokarddepression auch als „Hibernation“ (Winterschlaf; Levy et al. 2005), bei der der Energiehaushalt der Herzmuskelzellen stark herabgesenkt wird und damit einhergehend die Ausführung ihrer zellspezifischen Funktionen reduziert wird. Somit trägt dieser Mechanismus zum Schutz der Kardiomyozyten bei, die aufgrund ihres enorm gesteigerten Energiebedarfs, bei verminderter Energieversorgung, stark Zelltod gefährdet sind (Rudiger 2010). Studien zufolge korreliert dieser Mechanismus mit einem positiven *Outcome* der Patienten bei einem septischen Schock, da im Gegensatz dazu bei an der Sepsis versterbenden Patienten diese „Fehlfunktion“ nicht festgestellt wurde (Parker et al. 1984; Bouhemad et al. 2009).

1.2.2 Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie

Die septische Kardiomyopathie entwickelt sich aufgrund kardiodepressiver Faktoren (Abb. 6). Dabei handelt es sich u. a. um Toxine der eingedrungenen Mikroorganismen,

die systemischen Entzündungsmediatoren (z. B. $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$), aber auch um funktionelle Veränderungen wie eine schockbedingt, eingeschränkte Koronarperfusion. Zusammen bewirkt dies ein kardiodepressives Milieu, in dem das Herz in seiner Funktion beeinträchtigt wird (Hosenpud et al. 1989; Meldrum 1998; Maass et al. 2002).

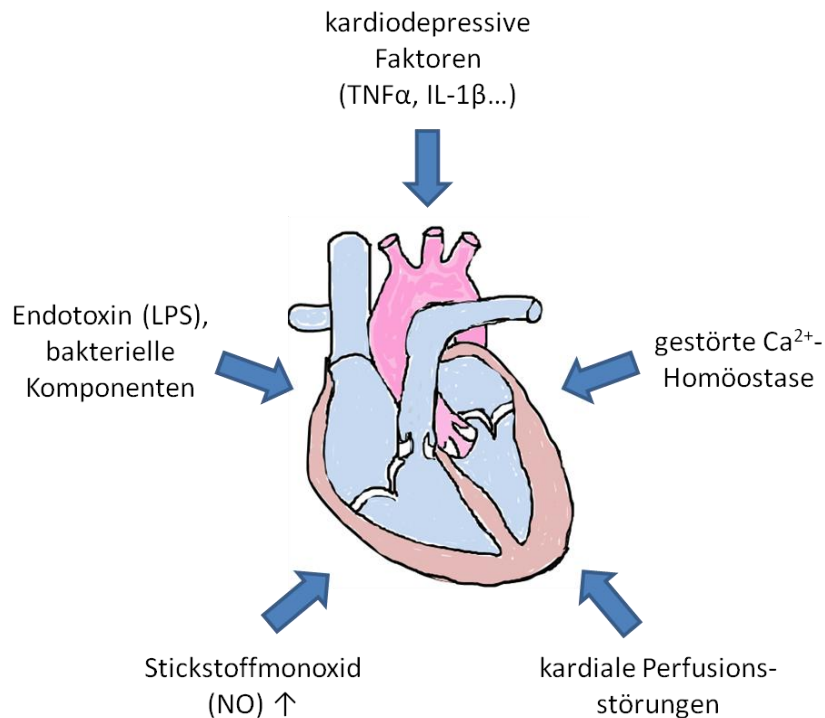


Abb. 6: Übersicht der pathophysiologischen Mechanismen bei der septischen Kardiomyopathie. Verschiedene Faktoren und Prozesse tragen zum Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie bei (modifiziert nach Olivo et al. 2006 und Hochstadt et al. 2011).

Die Toxine und Mediatoren induzieren eine Beeinträchtigung positiv inotroper und eine Stimulation negativ inotroper Signalkaskaden mit einer daraus resultierenden Pumpstörung des Herzens (Ebelt et al. 2011). Desweiteren tragen auf zellulärer Ebene eine veränderte Calciumhomöostase (Celes et al. 2013), die Synthese von Stickstoffmonoxid (Massion et al. 2003) und eine mitochondriale Dysfunktion zu einer reduzierten Kontraktilität der Kardiomyozyten bei. Durch einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch werden die Herzmuskelzellen in ein metabolisches Ungleichgewicht gebracht und der Herzmuskel weiter in die Pumpschwäche manövriert (Rudiger und Singer 2007).

Die Kardiomyozyten bilden die kleinste funktionelle Einheit des kardialen Gewebes. Eine Beeinträchtigung in der Funktion dieser Zellen kann zu einer Schädigung des gesamten Organs führen. Die Kardiomyozyten besitzen eine einzigartige Kombination

von Eigenschaften und weisen, neben ihrer Funktion als Muskelzellen, auch immunzelltypische Charakteristika auf. Dementsprechend sind sie in der Lage, verschiedene zirkulierende pathogene Mediatoren (PAMPs) über ihre TLRs zu erkennen (Nemoto et al. 2002; Boyd et al. 2006) und selbst proinflammatorische Entzündungsmediatoren zu produzieren (Kapadia et al. 1995; Grandel et al. 2000; Garner et al. 2003). Dieser Prozess führt zu einem weiteren Aufrechterhalten der systemischen Sepsiskaskade und hat eine gravierende Auswirkung auf die Herzmuskelfunktion. Die Schädigung der Herzmuskelzellen kann durch erhöhte Plasmatroponinspiegel in 30 – 80 % der Patienten nachgewiesen werden (Elst et al. 2000; Ebel et al. 2011).

1.2.3 Beeinträchtigung der autonomen Herzregulation

Ein weiterer wichtiger Punkt im Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie ist die Störung der autonomen Regulation der Herzfrequenz mit einer daraus resultierenden verminderten Herzfrequenzvariabilität (*HRV - heart rate variability*; Werdan et al. 2009). Der Verlust der HRV ist mit einer erhöhten Letalität von Patienten in der Sepsis assoziiert. Eine Anpassung der Herzfrequenz ist oftmals nicht mehr möglich, und auch die Kontraktilität kann nicht durch vermehrte Füllung der Herzkammern und Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes (Nachlasterhöhung) gesteigert werden (Schmidt et al. 2005a). Die Patienten versterben jedoch äußerst selten an malignen ventrikulären Rhythmusstörungen, wie dies bei Patienten mit akutem Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz vorkommt (Schmidt et al. 2005b). Warum allerdings die reduzierte HRV eine ungünstige Prognose während der Sepsis induziert und die kardiale Regulation durch das autonome Nervensystem in der Sepsis gestört ist, ist noch weitgehend ungeklärt. Vermutet wird jedoch, dass eine enge Verknüpfung zwischen Immunsystem und autonomem Nervensystem während der Inflammation besteht, welche durch den Begriff des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ beschrieben wird (Tracey 2007; siehe auch Kapitel 1.3.3). Vor allem dem Endotoxin wird eine große Bedeutung beim Auftreten der Herzfrequenzstarre bei septischen Patienten zugeordnet (Godin et al. 1996). So inhibiert es einerseits den Schrittmacherstrom an den Schrittmacherzellen des Sinusknotens und sensibilisiert andererseits diesen Schrittmacherstrom für den Sympathikus (Zorn-Pauly et al. 2007; Schmidt et al. 2007). Somit besteht eine

komplexe Interaktion, die zu einer Steigerung der Herzfrequenz führt, bei bestehender Herzfrequenzstarre aber keine Modulation bzw. Anpassung zulässt.

1.3 Der Einfluss des Nervensystems auf die Inflamationsreaktion

1.3.1 Die Entdeckung des Acetylcholins

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts veröffentlichte Otto Loewi seine Studien über den sogenannten „Vagusstoff“ (Loewi 1924), der später von Henry Dale als Acetylcholin bezeichnet wurde (Tansey 1991). In seinem Versuch experimentierte Loewi mit einem isolierten Froschherz, dessen Vagusnerv er elektrisch stimulierte (Abb. 7).

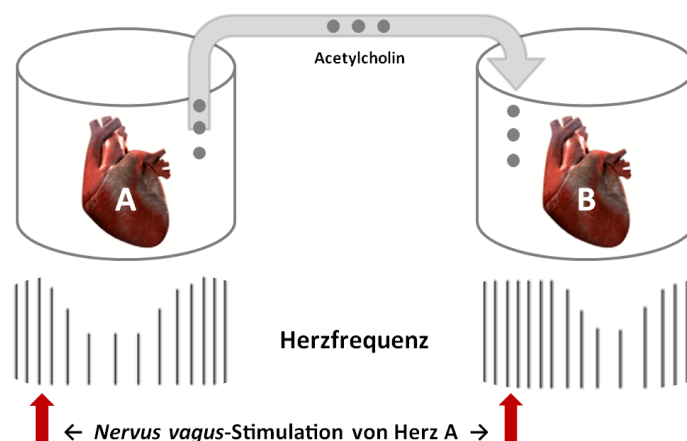


Abb. 7: Schematische Darstellung des Froschherzexperiments von Otto Loewi. Zwei isolierte Froschherzen wurden jeweils in einen mit Ringer-Lösung gefüllten Behälter gelegt. Der Vagusnerv von Herz A wurde stimuliert, die Herzfrequenz nahm ab. Anschließend wurde die Ringer-Lösung aus Behälter A, die jetzt den Transmitter Acetylcholin enthielt, zu Herz B gegeben. Herz B schlug nun auch langsamer (modifiziert nach Dani und Balfour 2011).

Mit der von diesem Herzen sezernierten Substanz schaffte er es anschließend, die Herzfrequenz eines weiteren unstimulierten Herzens zu erniedrigen. Damit konnte er beweisen, dass für die Weiterleitung der Nervenimpulse das Acetylcholin ($C_7H_{16}NO_2$) verantwortlich ist. Im Jahr 2000 gelangte das Acetylcholin erneut in den Fokus einiger Forscher, die ihm nun eine wichtige Rolle innerhalb der Immunreaktion zusprachen (Borovikova et al. 2000b).

1.3.2 Das cholinerge System in nicht-neuronalen Zellen

Phylogenetisch betrachtet existierte die Substanz Acetylcholin schon vor der Entwicklung jeglicher Nervensysteme in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. Trotzdem wurden die meisten Erkenntnisse über die Acetylcholinsynthese aus der Erforschung des Nervensystems gewonnen. Es konnten jedoch auch bei einer Vielzahl von nicht-neuronalen mammalianen Zellen (Keratinocyten, Krebszellen, Immunzellen etc.) cholinerge Komponenten (Abb. 8), die an der Synthese, dem Transport und dem Abbau von Acetylcholin beteiligt sind sowie muskarinerge und nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (m- und nAChR) für die Signalweiterleitung gefunden werden (Kawashima und Fujii 2008).

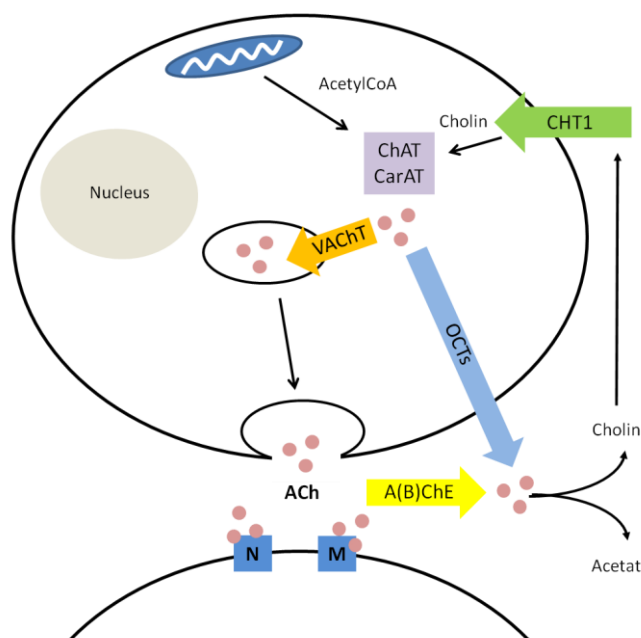


Abb. 8: Synthese, Abgabe und Abbau von Acetylcholin in nicht-neuronalen Zellen. Das Cholin wird mit Hilfe des Cholintransporters (CHT1) in die Zelle transportiert. Dort findet der Zusammenbau von Cholin und dem mitochondrialen AcetylCoA durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) oder Carnitinacetyltransferase (CarAT) zu Acetylcholin (ACh) statt. Das ACh wird nun durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in Vesikel eingeschlossen oder die Abgabe erfolgt durch organische Kationentransporter (OCTs). Das ACh bindet dann an die muskarinergen (M) oder nikotinergen (N) Acetylcholinrezeptoren der Zielzelle und wird anschließend durch Acetylcholinesterasen (AChE) bzw. Butyrylcholinesterasen (BChE) abgebaut (modifiziert nach Kummer et al. 2008).

Auch in Kardiomyozyten von Ratten wurde der Nachweis für die Expression Acetylcholin-produzierender Enzyme (Rana et al. 2010; Rocha-Resende et al. 2012) und nikotinerger Acetylcholinrezeptoren (Dvorakova et al. 2005) erbracht. Für die

Bildung von Acetylcholin aus Cholin, das zuvor von dem Cholintransporter (CHT1) aus dem Extrazellulärraum in die Zelle eingebracht wurde, und dem Acetyl Coenzym A (AcCoA) ist hauptsächlich das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) verantwortlich, wobei die Funktion auch durch die Carnitinacetyltransferase (CarAT) übernommen werden kann (Tucek 1982). Mit Hilfe des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) wird das Acetylcholin in Vesikel befördert und dort bis zur Freisetzung gelagert (Lips et al. 2007). Eine andere Möglichkeit der Acetylcholinabgabe besteht in der direkten Ausschüttung, ohne Zwischenlagerung, durch organische Kationen-transporter (OCTs; Wessler et al. 2001). Das in den synaptischen Spalt abgegebene Acetylcholin kann nun an seine spezifischen Rezeptoren der Zielzelle binden und dann durch Acetylcholinesterasen (AChE) wieder in seine zwei Bestandteile gespalten werden (Darvesh et al. 2003). Das wieder freigewordene Cholin kann nun erneut durch CHT 1 in den „Acetylcholinkreislauf“ eingebracht werden.

1.3.3 Der cholinerge antiinflammatorische Reflex – Die Bedeutung des efferenten *Nervus vagus*

Die Arbeitsgruppe um Kevin Tracey zeigte, dass der *Nervus vagus* bzw. sein hauptsächlichster Transmitter Acetylcholin an der Modulation der proinflammatorischen Zytokinexpression *in vitro* (bei Makrophagen) und *in vivo* (an Ratten mit septischem Schock) beteiligt ist (Borovikova et al. 2000b). Dazu erhielten bilateral vagotomierte Ratten in dieser Studie eine intravenöse Dosis Endotoxin (LPS) mit gleichzeitiger elektrischer Stimulation des efferenten Teils des Vagusnervs. Im Serum dieser Tiere wurden anschließend wesentlich niedrigere TNF- α -Spiegel gemessen als in den Kontrollratten ohne Stimulation. Diese Beobachtung stellte die Verbindung zwischen Immunsystem und autonomem Nervensystem heraus, und der Begriff des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ wurde postuliert (Tracey 2002). Die Aktivierung der cholinergen parasympathischen Nervenfasern führt zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren aus den immunmodulierenden Zellen. Im Falle der Sepsis ist das autonome System gestört und die Signalweiterleitung über die cholinergen parasympathischen Nervenfasern abgeschwächt, es kommt zu einer gesteigerten bzw. überschießenden Entzündungsreaktion (Tracey 2007).

Der *Nervus vagus* ist der X. Hirnnerv und stellt einen wichtigen Bestandteil des autonomen Nervensystems (ANS) dar. Über die IL-1-Rezeptoren auf den sensorischen Nervenzellen seines afferenten Teiles werden die vom Immunsystem gesammelten Informationen über die inflammatorischen Vorgänge in den peripheren Organen an das Gehirn weitergegeben (Maier et al. 1998; Blalock 2005). Im *Nucleus solitarius* angekommen, wird die Information zum *Ncl. dorsalis n. vagi* und *Ncl. ambiguus* geleitet. Diese enthalten den Ursprung der präganglionären Neuronen, deren Axone den efferenten Teil des *N. vagus* bilden. Nur 20 % der Fasern des zervicalen *N. vagus* sind efferent, dementsprechend bilden die afferenten Faser mit 80 % den größeren Anteil (Agostoni et al. 1957). Zuerst wurde vermutet, dass die Milz für den regulatorischen Inflammationseffekt benötigt wird, stellt sie doch den Hauptproduktionsort von systemischem TNF- α während der Endotoxinämie dar (Huston et al. 2006). Da der *N. vagus* jedoch die Milz nicht direkt innerviert (Bellinger et al. 1993), wurde auf eine indirekte Verbindung geschlossen (Abb. 9).

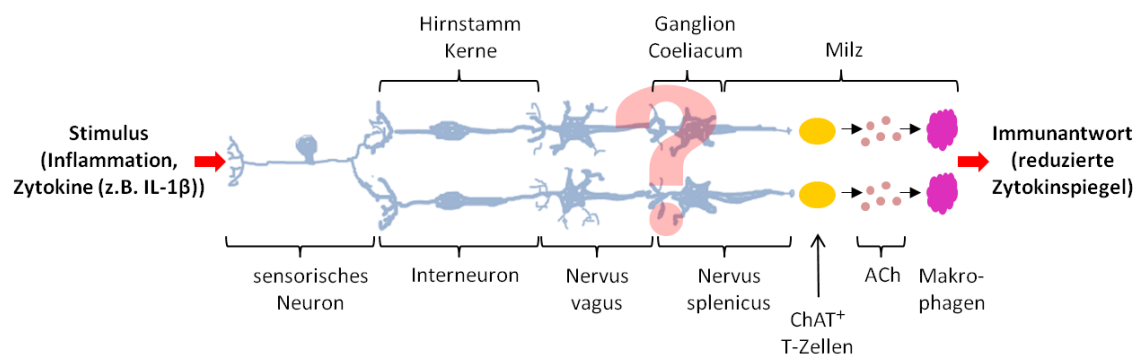


Abb. 9: Die Signalweiterleitung beim antiinflammatorischen Reflex. Sensorische Nervenzellen erfassen einen Entzündungsstimulus. Das Signal wird über Interneurone bis zum *Nucleus dorsalis* des Vagusnervs weitergegeben. Danach erfolgt die efferente Weiterleitung über den *Nervus vagus* zum *Ganglion Coeliacum*, wo die Verschaltung auf den *Nervus splenicus* erfolgt. Diese Verknüpfung ist jedoch fraglich (?). In den T-Zellen der Milz wird durch ankommende Aktionspotentiale die Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) veranlasst, welches dann an dem α_7 nAChR der Makrophagen bindet und die proinflammatorische Zytokin-freisetzung inhibieren soll (modifiziert nach Andersson und Tracey 2012).

Die vagalen präganglionären Neuronen würden dabei auf den die Milz durchziehenden *N. splenicus* verschaltet, dessen Fasern katecholaminergen, postganglionären sympathischen Ursprungs sind (Rosas-Ballina et al. 2008). In der Milz sind in der Nähe der adrenergen Nervenendigungen Acetylcholin produzierende CD^{4+} T-Zellen lokalisiert, die β -adrenerge Rezeptoren exprimieren (Rosas-Ballina et al. 2011). An den

postganglionären sympathischen Nervenfasern ankommende Aktionspotentiale führen bei diesen T-Zellen zu einer Sekretion von Acetylcholin, dessen antiinflammatorische Wirkung dann über die $\alpha 7$ -Untereinheit nikotinerger Acetylcholinrezeptoren ($\alpha 7$ nAChR) der Makrophagen vermittelt wird. Kürzlich wurde jedoch von Bratton et al. eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass die vagalen präganglionären Nervenendigungen nicht mit den sympathischen Neuronen, die in die Milz ziehen, verschaltet sind (Bratton et al. 2012). Daher wird über eine Beteiligung der Milz am antiinflammatorischen Reflex weiterhin kontrovers diskutiert.

Neben der Aktivierung des cholinergen antiinflammatorischen Reflexes durch eine direkte Stimulation des *N. vagus* kann eine Anregung auch über eine pharmakologische Cholinesteraseinhibition (z. B. mit Physostigmin und Neostigmin; Hofer et al. 2008) oder auch mit Hilfe cholinерger Agonisten (z. B. Nikotin), die spezifisch an den $\alpha 7$ nAChR der Makrophagen binden, erfolgen (Fodale und Santamaria 2008). In Studien mit dem $\alpha 7$ nAChR-Antagonisten α -Bungarotoxin konnte *in vitro* an Makrophagen gezeigt werden, dass durch die Blockade dieses Rezeptors die antiinflammatorische Wirkung von Nikotin und Acetylcholin nicht mehr besteht (Wang et al. 2003). Ebenso verhielt es sich *in vivo* bei Knockout-Mäusen, deren Gen für den $\alpha 7$ nAChR (*CHRNA7*) deaktiviert war (Wang et al. 2003). Die Herabsetzung der proinflammatorischen Zytokinsynthese in den Makrophagen erfolgt nach der Bindung des Liganden an den $\alpha 7$ nAChR und dem Auslösen des Signalweges durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Wang et al. 2004). Der $\alpha 7$ nAChR ist demnach, zusammen mit dem efferenten Anteil des *N. vagus* und dem Transmitter Acetylcholin, ein essenzieller Bestandteil des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Sepsis gehört derzeit, trotz intensiver Forschung und aller medizinischen Fortschritte, immer noch zu den Haupttodesursachen in der modernen Intensivmedizin. An der hohen Sterblichkeit bei der schweren Sepsis und dem septischen Schock ist die septische Kardiomyopathie erheblich beteiligt. Durch eine cholinerge Stimulation (direkt am *N. vagus* oder pharmakologisch) könnte die Hämodynamik während der

septischen Kardiomyopathie durch die immundämpfende Wirkung des freigewordenen Acetylcholins verbessert werden.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, das Millar-Katheter-System für die longitudinale Messung hämodynamischer Parameter im Herzen der anästhesierten Ratten sowie das Endotoxinämie-Modell als septisches Tiermodell zu etablieren. Dies beinhaltete u. a. das Austesten verschiedener LPS-Konzentrationen, um eine ausreichende Dosis Endotoxin für die Ausbildung einer septischen Kardiomyopathie herauszufiltern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung einer cholinergen Stimulation bezüglich der Hämodynamik, aber auch hinsichtlich der Expression von Entzündungsparametern im Plasma und im kardialen Gewebe der endotoxämischen Ratten, untersucht.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen überprüft werden:

- Verbessert sich die beeinträchtigte Herzfunktion der Ratten unter endotoxämischen Bedingungen durch eine kurz- bzw. langzeitige direkte oder pharmakologische cholinerge Stimulation?
- Wird die proinflammatorische Zytokinexpression im Plasma und im kardialen Gewebe durch die Stimulation beeinflusst?

2 Material

2.1 Geräte

Datenerfassungssystem; Powerlab 8/30	ADInstruments, USA
Feinwaage	Mettler Toledo, Schweiz
Gewebemühle	Retsch, Haan
Heizmatte (Small Homeothermic Blanket)	Hugo Sachs Elektronik/ Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Intubationsbrett (Sonderanfertigung, 75° Schräge)	Schreinerei Both, Oberursel
Kalibrierungsküvette	Millar, USA
Laryngoskop (modifizierter McIntosh-	WARAmed Medizintechnik,
Laryngoskopspatel für Kinder Größe 0)	Starnberg
Magnetrührer	Labor Brand, Gießen
Mahlkugeln (Durchmesser: 5 mm)	Retsch, Haan
Mikroplatten-Wascher; Elx50	BioTek, Bad Friedrichshall
Mikro-Tip Katheter; SPR-1000 (1 F)	Millar, USA
Mikro-Tip P/V-Katheter; SPR-838 (2 F)	Millar, USA
Narkosegas-Verdunster; Vapor 19.1	Drägerwerk, Lübeck
PCR-Cycler; Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
StepOne Plus™	Applied Biosystems, USA
PCR-UV-Workstation	PeqLab, Erlangen
Perfusor	Braun, Melsungen
Perfusor; "11" Plus	Harvard Apparatus, USA
pH-Meter	Mettler Toledo, Schweiz

Photometer	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten etc.)	FST, Heidelberg
Respirator; Inspira asv	Harvard Apparatus, USA
Sauerstoff-Messgerät	Drägerwerk, Lübeck
Sauerstoff-Sensor	EnviteC-W. GmbH, Wismar
Schüttler (Mikroplatten)	Heidolph, Schwabach
Signalaufbereitungssystem; MPVS Ultra™	Millar, USA
Spektralphotometer; Epoch	BioTek, Bad Friedrichshall
Stimulator (Vagusnerv)	DeMeTec, Langgöns
Temperatursonde (Flexible Probe, rektal)	Harvard Apparatus, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tierschermaschine	Aesculap® AG, Tuttlingen
Uhrmacherpinzette	Hogetu, Gosheim
Ultra-Mikromesszelle (Küvette)	Hellma, Müllheim
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vortexer	IKA, Staufen
Waagen	Mettler Toledo, Schweiz
	Satorius, Göttingen
Wärmelampe (Infrarot)	Physitemp, USA
Zentrifugen; Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge, Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Minifuge RF	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

12-Kanal Pipette Research (30 µl – 300 µl)	Eppendorf, Hamburg
--	--------------------

Einfriergefäße (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegspritze (1 ml - 20 ml)	Braun, Melsungen
Kanülen (18 G, 26 G)	BD, Heidelberg
Kanüle (Intubation); Vasocan Braunüle (16 G)	Braun, Melsungen
Knopfkanüle (Durchmesser: 1,5 mm)	Hero, Berlin
Katheter (Jugularv.); PE-Katheter (3 F; 33,5 cm)	Dispomedica, Hamburg
Katheter (Schwanzv.); BD Insyte-W™ (24 G)	BD, Heidelberg
Kompressen (10 cm x 10 cm)	Fuhrmann, Much
Labortücher	Kimberly-Clark, UK
Mikrotiterplatte (96-well)	Falcon, BD, USA
Nahtmaterial	Johnson-Johnson Intl., USA
Nitrilhandschuhe	Ansell, UK
PCR-Folie; Micro-Amp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, USA
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Nerbe Plus, Winsen
PCR-Reaktionsplatte; Micro-Amp® 96-well (0,1 ml)	Applied Biosystems, USA
Perfusor-Leitung (150 cm)	Braun, Melsungen
Perfusor-Spritze (50 ml)	Braun, Melsungen
Pflaster	Durapore, Neuss
Pipetten Reference (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	IBS, Schweiz
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-Seal-Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym, Hess. Oldendorf
Skalpellklingen	Swann-Morton®, UK
Spitzen, ep T.I.P.S. Reloads (0,1 µl - 10 µl)	Eppendorf, Hamburg
ep T.I.P.S. Standard (20 µl - 300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter, Millex® GP (0,22 µm)	Millipore, Irland

Unterlage, MoliNea [®] plus	Hartmann, Heidenheim
Verbindungsleitung mit 3-Wege Hahn	IMF GmbH, Lüdenscheid
Wattestäbchen	Beese, Bersbüttel
	Noba Verbandmittel, Wetter
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

2.3 Medikamente und Arzneimittel

Anticholium [®]	Köhler Chemie, Bensheim
Bepanthen Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Fentanyl	Ratiopharm, Ulm
Kodan [®] Hautantiseptikum	Schülke, Norderstedt
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	Braun, Melsungen
Natriumchloridkonzentrat 10 %	Braun, Melsungen
Ringer-Lösung	Braun, Melsungen
Sauerstoff (med.)	Linde, Unterschleißheim
Stickstoff	Linde, Unterschleißheim

2.4 Chemikalien und Lösungen

BSA Set Pre-Diluted Protein Assay	Thermo-Scientific, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Enzymlösung Terg-A-Zym	Alconoc, Inc., USA
Ethanol; absolut	Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethanol; vergällt	Fischar GmbH, Saarbrücken
HEPES	Roth, Karlsruhe
Instrumentenreiniger	Merz, Frankfurt
LPS-EB Ultrapure (<i>E.coli</i> 0111:B4)	Invivogen, USA
Paraffinöl	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor; Complete Mini	Roche, Mannheim
TRIzol Reagent	Life Technologies, USA
Wasser dest.	Braun, Melsungen
Wasser; Nuklease frei	Roth, Karlsruhe

2.5 Komplettsysteme

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
Quantikine® Immunoassay (TNF- α , IL-1 β)	R&D Systems, USA
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, USA

2.6 TaqMan® Gene Expression Assays

ChAT (Cholinacetyltransferase)	Rn01453446_m1	Applied Biosystems, USA
ChAT (Cholinacetyltransferase)	Rn01453442_m1	Applied Biosystems, USA
CarAT (Carnitinacetyltransferase)	Rn01758585_m1	Applied Biosystems, USA
TNF- α (Tumornekrosefaktor α)	Rn01525859_g1	Applied Biosystems, USA
β -Actin (Beta-Actin)	Rn00667869_m1	Applied Biosystems, USA

2.7 Software

Gen5™	BioTek, Bad Friedrichshall
Graphpad Prism	Graphpad Software, USA
LabChart Pro	ADInstruments, USA
MPCU2PV	DeMeTec, Langgöns
PVAN Ultra®	Millar, USA
StepOne™ Software	Applied Biosystems, USA

2.8 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen Ratten des Inzuchtstammes Lewis (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt. Das Gewicht der Versuchstiere betrug zum Zeitpunkt der Lieferung 275 g - 300 g. Die Unterbringung der Ratten erfolgte im klimatisierten Tierstall Klinik Seltersberg, Haus C, Gießen mit 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus. Den Ratten wurde freier Zugang zu Wasser und Futter in Pelletform (Altromin, Lage) gewährt. Nach mindestens 5-tägiger Eingewöhnungszeit wurden die Tiere für die Experimente aus dem Tierstall entnommen und ins Labor gebracht.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) nach Erteilung der Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben Nr. 108-2010 (Kurztitel: Acetylcholin und septische Kardiomyopathie), die am 03.05.2011 vom Regierungspräsidium Gießen erteilt wurde.

3 Methoden

3.1 Studiendesign und Versuchsablauf

Um den kardioprotektiven Effekt einer *Nervus vagus*-Stimulation im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie zu untersuchen, wurden in endotoxämischen Lewis-Ratten hämodynamische Messungen durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeit erfolgten die Etablierung des Millar-Katheter-Hämodynamiksystems und die Charakterisierung des Modells. Später wurden folgende Gruppen untersucht (Tab. 1 und Abb. 10):

Tab. 1: Einteilung der verschiedenen Versuchsgruppen.

Gruppe	LPS (1 mg/kg KG)	Beschreibung	Anzahl der Versuchstiere n =
1	-	Kontrollgruppe 1: Tiere aus Etablierungsphase wurden als gesunde Referenzgruppe in die Auswertung einbezogen	6
2	+	Kontrollgruppe 2: mit LPS	6
3	+	Anticholium® (Physostigmin) i.v. (80 µg/kg KG)	5
4	+	Kontrollgruppe 3: Vagotomie, ohne <i>N. vagus</i> -Stimulation, nur Anbringen der Elektrode	5
5	+	Vagotomie und <i>N. vagus</i> -Stimulation für 2 min	6
6	+	Vagotomie und <i>N. vagus</i> -Stimulation für 20 min	6

Ratten in der Gruppe 1 wurden nur katheterisiert. Versuchstiere aus der Gruppe 2 erhielten einen LPS-Bolus (1 mg/kg KG) i.v., Ratten aus Gruppe 3 wurde vor LPS-Gabe einen Anticholium®-Bolus (80 µg/kg KG) i.v. verabreicht. Nach der LPS-Injektion wurde der Cholinesteraseinhibitor stetig infundiert (12,5 µg/kg/h). In den Gruppen 4 - 6 erfolgte neben der zervikalen Vagotomie am rechten *N. vagus* die Anbringung einer Elektrode zu Stimulationszwecken mit unterschiedlicher Stimulationsdauer. Die Datenerfassung erfolgte über einen Zeitraum von maximal 6 Stunden. Danach wurden die

Tiere durch eine Vertiefung der Narkose und Entbluten getötet. Zur weiteren Analyse wurden Blutproben gesammelt und das Herz entnommen.

Die entsprechenden Maßnahmen für die Katheterisierung erfolgten in einem Zeitfenster von 30 – 60 Minuten. Im Anschluss an eine 30-minütige Stabilisierungsphase wurde den Tieren ein NaCl- bzw. LPS-Bolus (1 mg/kg KG i.v.) injiziert und die für die Versuchsgruppe vorgesehene Behandlung durchgeführt (Abb. 10).

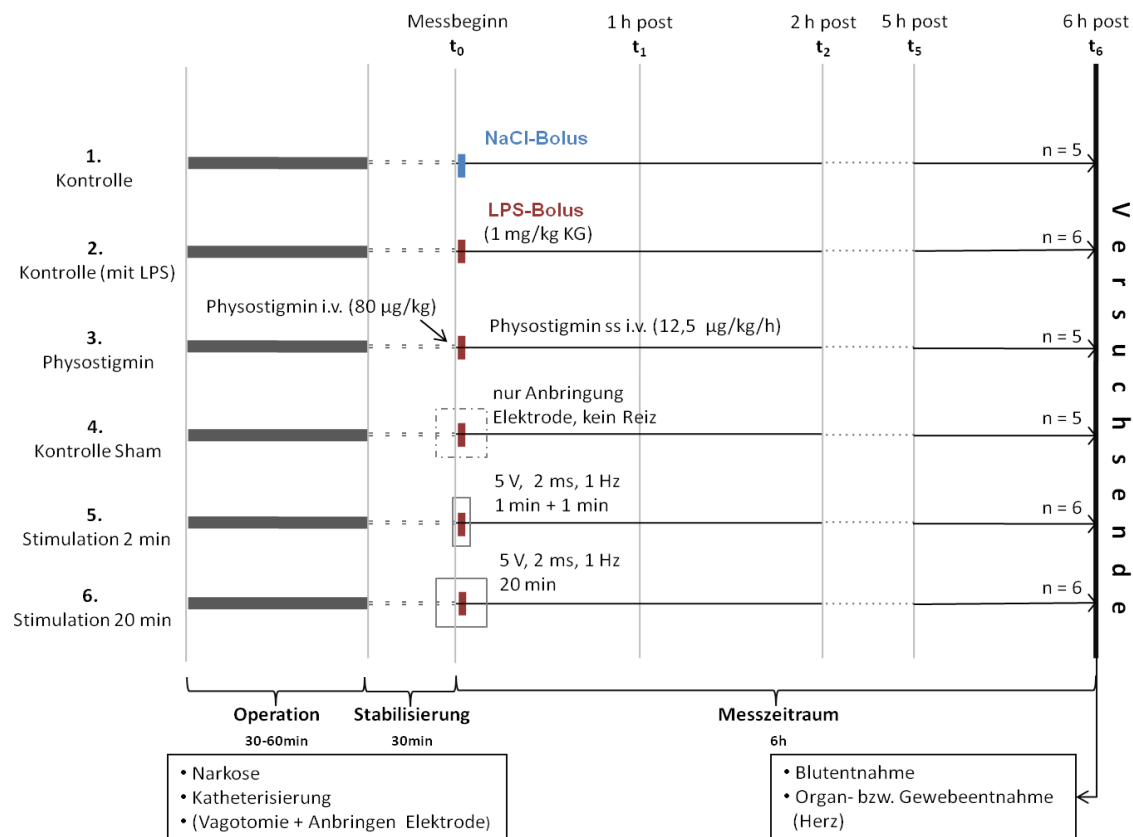


Abb. 10: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsabläufe. Die Versuche wurden in 6 verschiedene Gruppen unterteilt. Ab Zeitpunkt t_0 erfolgte die Aufnahme der Messungen. Das Versuchsende wurde mit dem Tod der Ratte bzw. maximal nach 6 Stunden Messdauer erreicht (nach Florian Uhle).

Der allgemeine Versuchsablauf war für alle Versuchsgruppen gleich. Die gesamte Präparation beinhaltete die Intubation, die Kanülierung der linken Kollateralvene im mittleren hinteren Bereich des Schwanzes, das Einlegen des Druck/Volumen-Katheters in den linken Ventrikel sowie des Tip-Katheters in die Schwanzarterie und das Katheterisieren der *Vena jugularis* mit einem PE-Katheter. Bei den Gruppen 4 - 6 wurde zusätzlich der rechte *N. vagus* freipräpariert, durchtrennt und eine bipolare Stimulationselektrode an das distale Ende angelegt.

3.2 Induktion der septischen Kardiomyopathie

Nach der 30-minütigen Stabilisierungsphase, in der sich die Ratten von den operativen Eingriffen erholten, folgte die Induktion der Endotoxinämie durch die i.v.-Applikation von 1 ml LPS-Lösung (1 mg/kg KG in 0,9 % NaCl) über 20 Minuten in die Schwanzvene durch einen speziellen, für kleine Volumina geeigneten, Perfusor. Ratten aus der Kontrollgruppe erhielten einen gleich großen NaCl-Bolus. Das mit der Phenol-TEA-DOC-Methode aufgereinigte LPS (*E.coli*, 0111:B4) wurde vor Beginn der Versuche in steriler 0,9 %iger isotoner Kochsalzlösung gelöst (Stock-Lösung: 5 mg/ml), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde die dem Gewicht der Ratte entsprechende Verdünnung mit steriler Kochsalzlösung (0,9 %) hergestellt. Da sich das LPS aufgrund seines amphiphilen Charakters in wässriger Lösung zu Aggregaten in Form von Mizellen zusammenlagert, wurde die LPS-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C im Ultraschallbad sonifiziert.

3.3 Hämodynamik-Messungen mit dem Millar-Konduktanz-Katheter

Die hämodynamischen Messungen erfolgten mit Hilfe eines Druck/Volumen-Konduktanz-Katheters (Millar SPR-838, 2 F). Damit konnten *in vivo* Druck- und Volumenkurven des linken Ventrikels in Echtzeit aufgezeichnet werden und durch eine anschließende Analyse die Ventrikelfunktion bewertet werden. Seit Mitte der 1990iger Jahre kann diese Technik, welche schon in den 1980iger Jahren bei Menschen und Großtieren genutzt wurde (Baan et al. 1984), auch im Kleintiermodell angewendet werden (Georgakopoulos et al. 1998).

An der Spitze des Katheters ist ein Drucksensor lokalisiert, welcher paarweise von vier Elektroden, die zum Messen des Ventrikelvolumens dienen, umgeben ist. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Erfassung der Leitfähigkeit (Konduktanz) des Blutes, welche dann in relative Volumeneinheiten umgerechnet wird. Durch die äußeren Elektroden (E4 und E1, Abb. 11) fließt ein konstanter Strom, der so ein elektrisches Feld zwischen diesen beiden Elektroden im linken Ventrikel generiert. Die inneren Elektroden (E3 und E2) messen einen wechselnden Potentialunterschied, der durch die Volumenänderung und damit einer unterschiedlichen Leitfähigkeit des Blutes im linken

Ventrikel während eines Herzzyklus zustande kommt. Da mit dieser Technik nicht nur die Leitfähigkeit des Blutes im linken Ventrikel, sondern auch die der umgebenden Gewebe (Myokard, Lunge etc.) gemessen wird, muss diese sogenannte Parallel-Konduktanz von der gesamten Konduktanz abgezogen werden. Erst dann erhält man das exakte Volumen des linken Ventrikels. Durch das kurzzeitige Ändern der Leitfähigkeit des Blutes kann die Parallel-Konduktanz bestimmt werden. Dies geschieht meist durch die Injektion einer geringen Menge hypertonen (10 %iger) Kochsalzlösung über die *Vena jugularis* in den Kreislauf (Baan et al. 1984 und Steendijk et al. 2001).

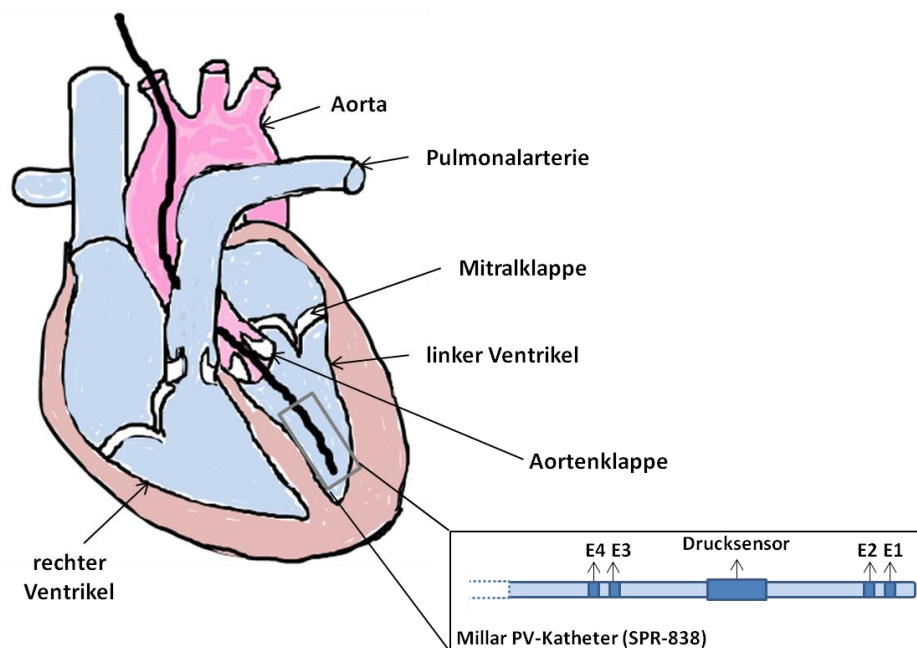


Abb. 11: Schematische Darstellung der Lage des Druck/Volumen-Katheters im linken Ventrikel. Über die Aorta wird der Katheter in den linken Ventrikel eingebracht. An der Katheterspitze befinden sich 4 Elektroden (E1 - E4) sowie ein Drucksensor (modifiziert nach Pacher et al. 2008).

Mit Hilfe der folgenden Formel lässt sich das genaue Volumen des linken Ventrikels bestimmen:

$$V = \frac{1}{\alpha}(\rho L^2)(G - Gp)$$

wobei V = das Volumen im Ventrikel, α = ein Volumenkalibrationsfaktor, ρ = der elektrische Widerstand des Blutes und L = der Abstand zwischen den Elektroden ist.

G wird als Gesamt-Konduktanz bezeichnet, während G_p die Parallel-Konduktanz des umgebenden Gewebes darstellt (Pacher et al. 2008).

Aus den von dem Konduktanz-Katheter aufgenommenen Daten, lassen sich in Echtzeit Druck/Volumen-Kurven ableiten (Abb. 12), an denen die verschiedenen Phasen des Herzzyklus zu erkennen sind.

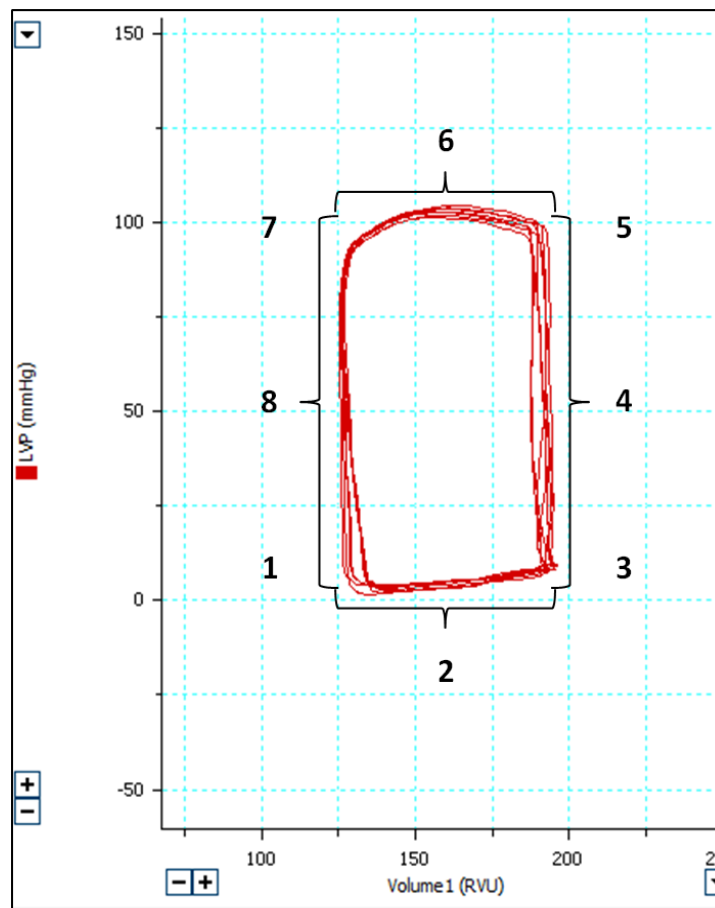


Abb. 12: Linksventrikuläre Druck/Volumen-Kurven einer Lewis-Ratte unter Normalbedingungen. Die Druck/Volumen-Kurven (unkalibriert) wurden durch die Verwendung eines Millar P/V-Katheters generiert. Die Zahlen bezeichnen die verschiedenen Phasen innerhalb eines Herzzyklus (siehe Text). Die X-Achse gibt die relativen Volumeneinheiten (RVU) an, die Y-Achse den Druck im linken Ventrikel (LVP in mmHg). Die für die Abbildung ausgewählten Kurven stellen ein repräsentatives Beispiel dar.

Durch die Öffnung der Mitralklappen (1) kommt es zur diastolischen Füllung des linken Ventrikels (2) bis zum Schließen der Klappen (3). Auf die isovolumetrische Kontraktion (4) folgt die Öffnung der Aortenklappen (5), durch die der Beginn der Auswurfphase (6) gekennzeichnet ist. Mit dem Schließen der Aortenklappen (7) wird die isovolumetrische Relaxationsphase (8) erreicht.

3.4 Durchführung der Katheterversuche

Vor jedem Versuch wurde der Arbeitsplatz mit dem entsprechenden OP-Besteck ausgestattet. Zudem wurde über die Wärmematte eine saugfähige Unterlage gelegt um größere Verunreinigungen mit Blut und anderen Flüssigkeiten zu vermeiden. Außerdem wurden Pflaster für die Fixierung des Tieres vorbereitet. Desweiteren wurde die Funktionsfähigkeit der Geräte (Laryngoskop, Respirator, Wärmematte und Perfusor) überprüft. Der Tubus für die Intubation wurde gefettet und auf den Führungsstab gefädelt. Die Katheter wurden vor Gebrauch (mindestens für 30 Minuten) in 37 °C warme NaCl-Lösung (0,9 %) gelegt. Anschließend wurde die Kalibrierung des Druckes durchgeführt. Zum Schluss der Vorbereitungen wurde das Gewicht der Ratte bestimmt und damit das Tidalvolumen (V_t) und die Atemfrequenz (AF) am Respirator entsprechend der Formel ($V_t, \text{ml} = 6.2 \times M^{1.01}$ und $(AF, 1/\text{min}) = 53.5 \times M^{0.26}$ bezogen auf das individuelle Gewicht der Ratte berechnet und eingestellt. Diese Daten wurden außerdem in ein dafür vorgesehenes Protokoll handschriftlich eingetragen, in dem auch alle 15 Minuten die Vitalparameter (arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, rektale Temperatur, Sauerstoffkonzentration der Atemluft (FiO_2) und Isoflurankonzentration) und der zeitliche Fortschritt der Präparation vermerkt wurden. Die Messungen begannen mit dem Zeitpunkt t_0 kurz vor Injektion des LPS-Bolus. Danach wurde alle 30 Minuten ein Marker gesetzt und entsprechend mit $t_{0.5}$, t_1 , $t_{1.5}$ etc. bezeichnet. Mit Hilfe dieser Marker konnten später offline die Druck/Volumen-Kurven für die Auswertung ausgewählt werden.

Nach Versuchsende wurde die Narkose durch eine Erhöhung der Isoflurankonzentration auf 5 %, vertieft. Anschließend wurde die Ratte durch Entbluten getötet. Das Herz wurde entnommen und mit einer Knopfkanüle mit NaCl-Lösung perfundiert. Danach wurden die Atrien von den Ventrikeln getrennt, die beiden Herzkammern separiert und jeweils in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Gewebestückchen für wenige Minuten in flüssigen Stickstoff gegeben, dann in Einfriergefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Das Blut wurde in ein heparinisiertes Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das erhaltene Plasma aliquotiert und bei -80 °C für weitere Analysen gelagert.

Die Volumenkalibration des Konduktanz-Katheters wurde mit heparinisiertem Blut von 2 Ratten durchgeführt. Dafür wurde eine Kalibrierungs-Küvette mit exakt bekannten

Volumina (254,47 μl , 452,39 μl und 855,30 μl) verwendet. Später konnten in der Auswertung so die relativen Volumeneinheiten mit Hilfe der erhaltenen Kalibrationswerte in „echte“ Volumina umgerechnet werden.

3.4.1 Narkoseeinleitung und Intubation

Die Einleitung der Narkose erfolgte nach stressfreiem Verbringen der Tiere in eine Ganzkörperkammer (Abb. 13 A) mit einer Voranflutung von 5 % Isofluran unter 100 % O_2 . Nach Abklingen der Exzitationsphase und Erlöschen des Stellreflexes wurde die Ratte endotracheal intubiert. Das Tier wurde dazu mit den oberen Schneidezähnen in eine Schlinge eingehängt (Abb. 13 B), die oben an der Intubationsfläche befestigt war. Unter Sicht, mit Zuhilfenahme eines Laryngoskops, wurde die Ratte nun intubiert. Als Tubus diente eine großlumige Venenverweilkanüle (16 G), die über einen Führungsdraht (zentraler Venenkatheter (ZVK)) in die Trachea geschoben wurde. Nach Intubation erfolgte die schnelle Übernahme an die maschinelle Beatmung. Dazu wurde die Ratte in Rückenlage auf die Wärmematte gelegt und an das Beatmungsgerät über den Tubus konnektiert (Abb. 13 C).

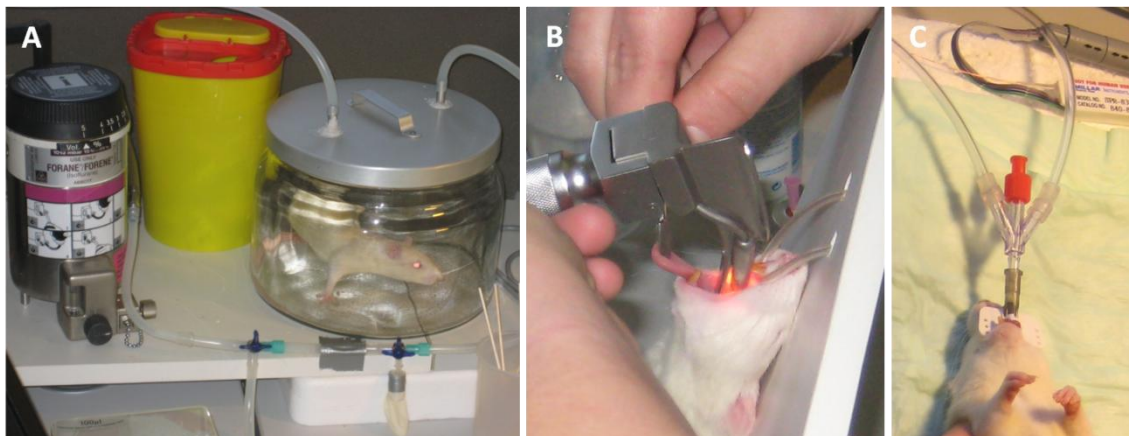


Abb. 13: Einleitung der Narkose und Intubation der Ratte. Die Narkosegaskammer wurde mit Isofluran vorgeflutet und die Ratte in die Kammer (A) gesetzt. Nach Erlöschen der Reflexe erfolgte die Intubation am Schrägbrett mit Hilfe eines Laryngoskops (B) und danach das Anschließen an das Beatmungsgerät (C).

Die korrekte Lage des Tubus wurde nun durch die „Spiegelprobe“ überprüft. Dazu wurde der Beatmungsschlauch kurzzeitig entfernt und ein kleiner Spiegel vor die

Öffnung des Tubus gehalten, beschlug dieser war die Intubation erfolgreich durchgeführt worden.

3.4.2 Beatmung

Nach der Intubation wurde die Ratte für weitere 5 Minuten mit 100 % Sauerstoff beatmet, danach erfolgte die Absenkung der Konzentration auf 40 % Sauerstoff mit 60 % Stickstoff. Die tatsächliche Sauerstoffkonzentration des Atemgases wurde am inspiratorischen Schenkel zwischen Beatmungsgerät und Verbindungsstück gemessen und der Gasfluss mit einem Durchflussmesser reguliert. Die Isoflurankonzentration wurde nach der Intubation auf 3 % reduziert, um eine ausreichende Tiefe der Narkose während der Präparation zu gewährleisten. Nach der Präparation wurde die Isoflurankonzentration weiter auf 2 % abgesenkt.

3.4.3 Monitoring

Unmittelbar nach der Intubation wurde die Ratte in Rückenlage auf einer Wärmematte fixiert und der Hals- und Brustbereich mit einer elektrischen Schermaschine entfellt. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde über die gesamte Versuchsdauer gemessen und sollte dabei mit Hilfe einer Infrarot-Wärmelampe konstant auf 37 °C gehalten werden. Unter Verwendung eines EKGs wurde kontinuierlich die elektrische Herzaktivität abgeleitet und aufgezeichnet (Abb. 15, rosa Kurve). Dazu wurden drei Stichelektroden in die Haut eingebracht: Eine in die Leistenregion der oberen rechten Extremität und jeweils eine in die Leistengegend der beiden unteren Extremitäten.

Nun erfolgte die Punktion der Kollateralvene am basalen Schwanzende mit einer Venenverweilkanüle (24 G). Zur Erweiterung des Gefäßes wurde der Schwanz zuvor ein paar Minuten in warmes Wasser getaucht. Zur Kontrolle der richtigen Lage wurden 0,5 ml Ringerlösung nach vorherigem Fluten des Konnektors injiziert. Über diesen Zugang wurden im gesamten Verlauf des Versuchs die Infusion von Fentanyl (10 µg/kg KG/h) und Ringerlösung (10 ml/kg KG/h) zur intraoperativen Analgesie und Flüssigkeitstherapie verabreicht.

3.4.4 Katheterisierung

Für die Überwachung des arteriellen Blutdruckes wurde ein Mikro-Tip Katheter (Druckmesskatheter; 1 F) in die Schwanzarterie eingelegt. Dazu wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt mit dem Skalpell median des Schwanzes durchgeführt und bis zur Fäzие stumpf präpariert. Diese wurde mit dem Skalpell nun vorsichtig inzisiert und dem Verlauf der Arterie nach weiter eröffnet. Das die Arterie umgebende Gewebe wurde entfernt und das Gefäß mittels einer gebogenen Uhrmacherpinzette vorgelagert (Abb. 14 A). Anschließend wurde die Arterie mit einer distalen und proximalen Ligatur versehen, die mit Hilfe von Nadelhaltern auf Zug gehalten wurden. Zusätzlich wurde zwischen diesen Ligaturen eine weitere Ligatur angebracht. Das Gefäß wurde mit der distalen Ligatur abgebunden, die mittlere Ligatur wurde mit einem lockeren chirurgischen Knoten vorbereitet. Mit einer gebogenen Kanüle (90 °, Schliff nach oben zeigend) erfolgte die Punktion der Arterie. Durch das entstandene Loch wurde der Tip-Katheter nun vorsichtig ca. 5 cm in das Gefäß geschoben. Nachdem die Katheterspitze die mittlere Ligatur passiert hatte, wurde diese zugezogen, um den Katheter im Gefäß zu fixieren (Abb. 14 B).

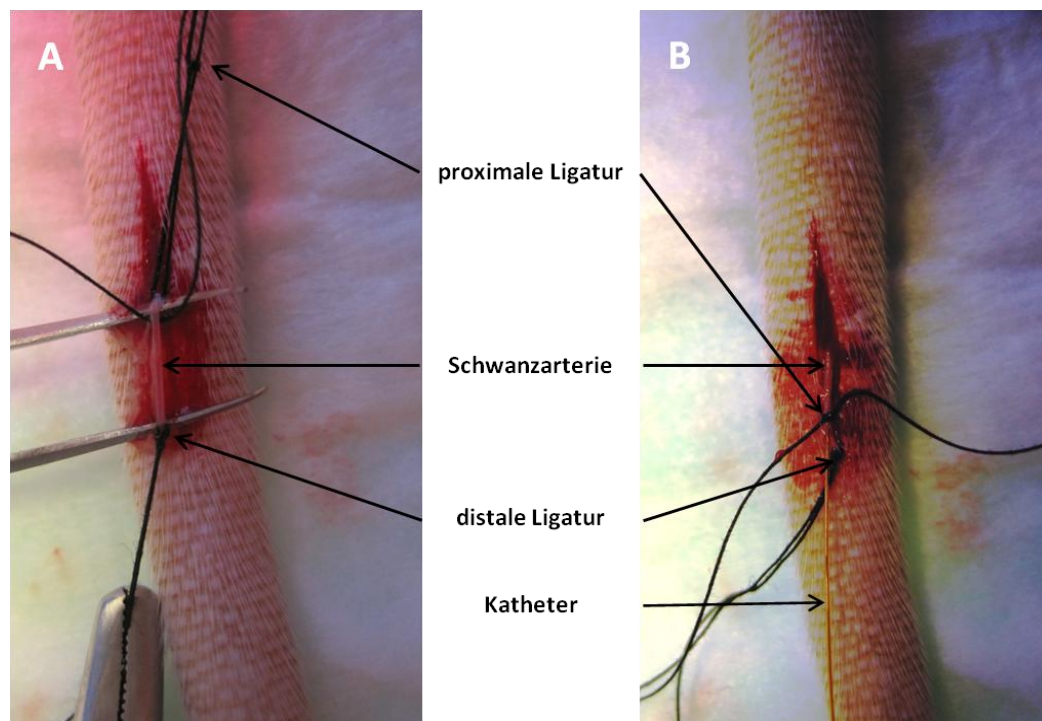


Abb. 14: Katheterisierung der Schwanzarterie bei der Ratte. Die Schwanzarterie wurde nach dem Freipräparieren mit einer Uhrmacherpinzette vorgelagert und die entsprechenden Ligaturen gesetzt (A). Danach wurde das Gefäß punktiert und der Katheter in die Arterie eingelegt (B).

Die Nadelhalter an den Ligaturen und die Uhrmacherpinzette wurden entfernt und der Katheter in seiner Lage so korrigiert, dass eine Druckkurve aufgezeichnet werden konnte (Abb. 15, blaue Kurve). Die freigelegte Arterie wurde zum Schutz vor Austrocknung mit einer feuchten Kompresse bedeckt.

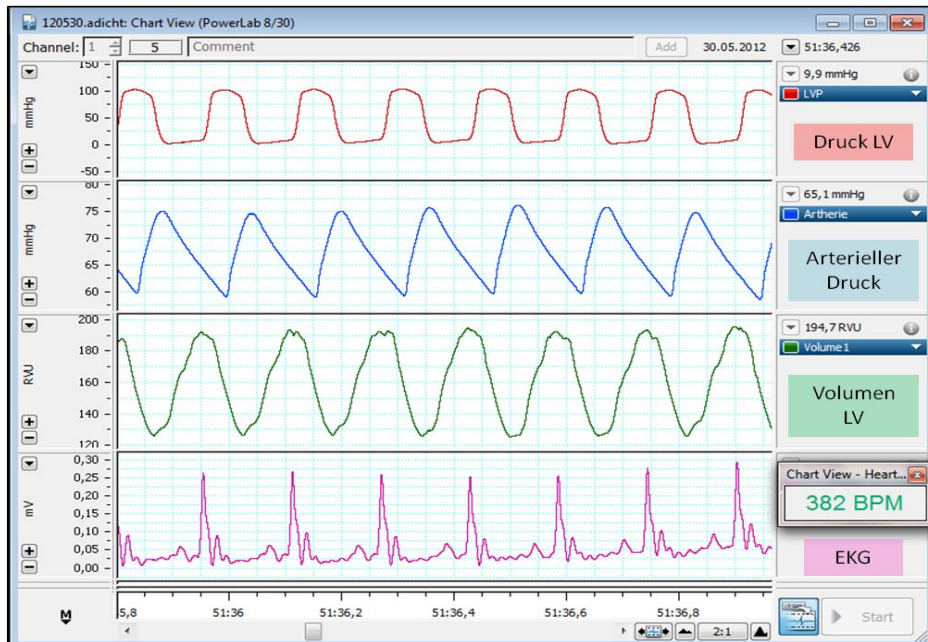


Abb. 15: Gesamtübersicht der aufgezeichneten Parameter mit der Software LabChart. Die Kurven stellen den Druck im linken Ventrikel (LV, rot) und der Schwanzarterie (blau) sowie das Volumen im linken Ventrikel (grün) dar. Die unterste Zeile zeigt die EKG-Ableitung (rosa) mit entsprechender Herzfrequenz in [bpm]. Die für die Abbildung ausgewählten Kurven stellen ein repräsentatives Beispiel dar.

Zur Untersuchung der linksventrikulären Funktion wurde aufgrund ihres geringeren invasiven und stabileren Charakters die OP-Methode mit „geschlossenem Brustkorb“ („*closed-chest approach*“; Pacher et al. 2008) angewendet, bei der der Messkatheter über die *Arteria carotis* in den linken Ventrikel eingebracht wird. Dafür wurde ein umgekehrter T-Schnitt im Halsbereich durchgeführt. Der darunterliegende Muskel wurde vorsichtig stumpf aufpräpariert und zum Erhalt einer besseren Sicht mit einem Faden weggespannt. Die rechte *Arteria carotis communis* wurde vom *Nervus vagus* getrennt und dargestellt (Abb. 16 B). Das Anbringen der Ligaturen erfolgte wie bei der Präparation der Schwanzarterie mit einer distalen und proximalen Ligatur sowie einer Sicherungsligatur in der Mitte.

Nach der Punktion des Gefäßes mit einer gebogenen Kanüle wurde der Druck/Volumen-Katheter sehr vorsichtig und ohne Kraftaufwand bis zum Anschlag durch die

Arterie geschoben (Abb. 16 A) und mit der mittleren Ligatur fixiert. Ein leichtes Zittern des Katheters ließ dann auf eine Lage vor den Aortenklappen schließen.

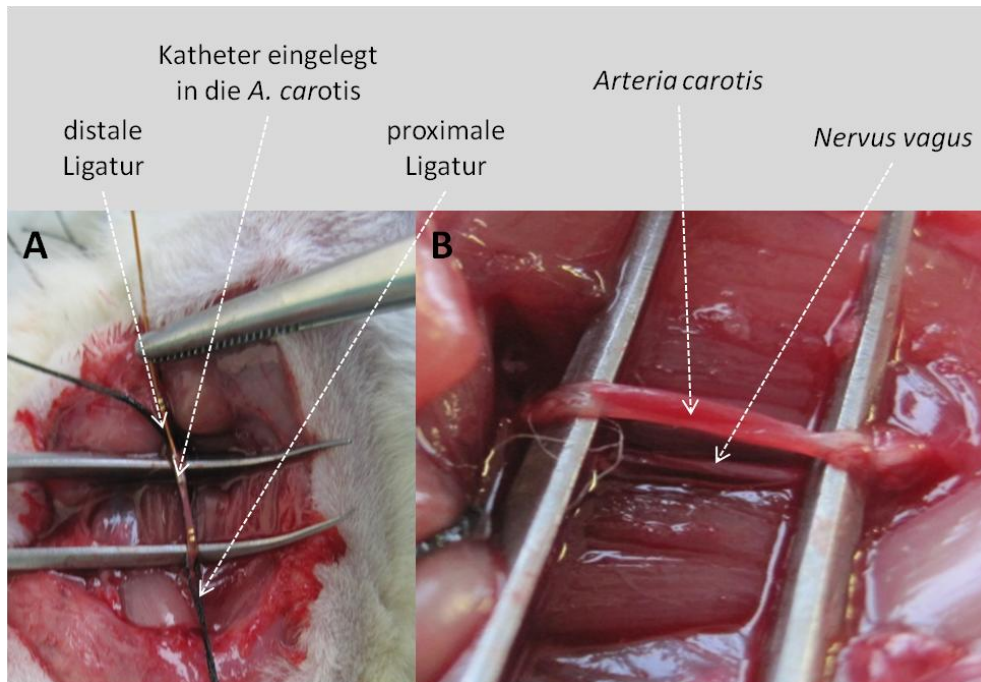


Abb. 16: Darstellung der *Arteria carotis communis dextra* und des *Nervus vagus*. Nach der Punktion des Gefäßes wurde der Druck/Volumen-Katheter in die Arterie eingebracht (A). Zuvor wurde der Vagusnerv von der Carotis Arterie getrennt (B).

Der Katheter wurde an dieser Stelle nun immer wieder leicht zurück und dann nach vorne bewegt, bis er die Aortenklappen passiert und die richtige Lage im Ventrikel eingenommen hatte. Die korrekte Position konnte anhand der aufgezeichneten Druckkurve am Monitor bestimmt werden (Abb. 15, rote und grüne Kurve sowie Abb. 17).

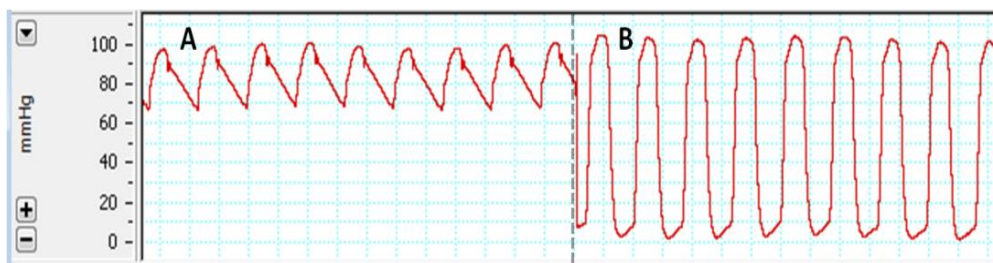


Abb. 17: Druckkurve in der Aorta und im linken Ventrikel. Die Lage des Katheters konnte durch die Aufzeichnungen auf dem Monitor bestimmt werden. In der Aorta (A) liegend zeigt die Druckkurve einen typischen arteriellen Verlauf. Im linken Ventrikel (B) positioniert kommt es zum Abfall des diastolischen Drucks. Die für die Abbildung ausgewählte Druckkurve stellt ein repräsentatives Beispiel dar.

Das Operationsfeld wurde nach erfolgreicher Katheterisierung zum Schutz vor Austrocknung mit einer feuchten Kompresse abgedeckt.

3.4.5 Kalibrierung der Parallel-Konduktanz

Zur Bestimmung der Parallel-Konduktanz wurde die rechte *Vena jugularis* stumpf freipräpariert und dargestellt. Nach dem Setzen der entsprechenden Ligaturen (siehe Kapitel 3.4.4) und Punktion der Vene wurde ein PE-Katheter (3 F) in das Gefäß eingeschoben (Abb. 20). Für die Kalibrierung wurde die Beatmung für ein paar Sekunden abgeschaltet und gleichzeitig 20 μ l NaCl-Lösung (10 %) über den Katheter in den Kreislauf injiziert. Durch den Einstrom der hypertonen NaCl-Lösung kam es zu einer Verschiebung der Druck/Volumen-Kurven nach rechts (Veränderung der Konduktanz), während der Druck unverändert blieb (Abb. 18).

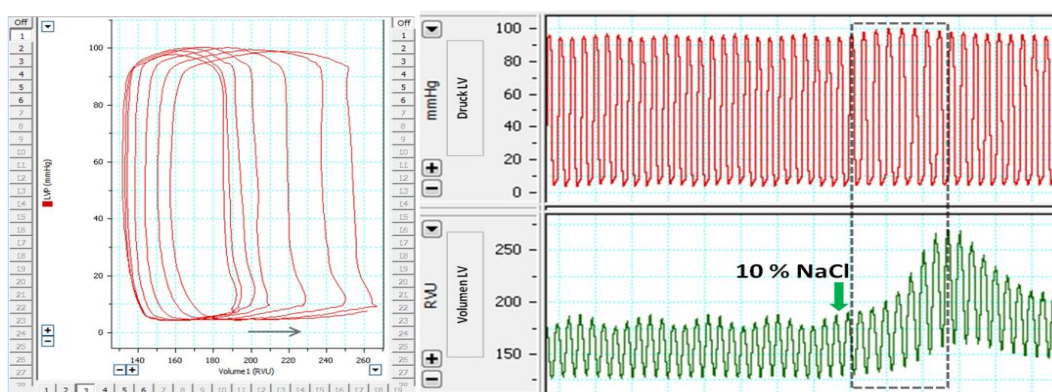


Abb. 18: Veränderung des Konduktanz-Signals im linken Ventrikel während der Injektion hypertonen NaCl-Lösung. Nach Verabreichung der NaCl-Lösung (grüner Pfeil) kommt es zum Anstieg der Konduktanz (RVU, *relative volume units*; grüne Kurve) und damit zu einer Verschiebung der Druck/Volumen-Kurven nach rechts (linke Darstellung, schwarzer Pfeil). Der Druck (mmHg) bleibt dabei unverändert (rote Kurve). Das gestrichelte Rechteck gibt die ausgewählten Kurven an, die in der Druck/Volumen-Ansicht zu sehen sind. Die für die Abbildung ausgewählten Kurven stellen ein repräsentatives Beispiel dar.

Die Leitfähigkeit des Blutes im Ventrikel wurde durch die Injektion kurzzeitig verändert. So konnte ein veränderter Leitwert und damit ein verändertes Volumen in der Enddiastole (V_{ED}) bzw. Endsystole (V_{ES}) gemessen werden. Für die Berechnung des parallelen Volumens (V_p) wurden in der Auswertung die Werte von V_{ED} und V_{ES} jedes Herzschlages während der Signalveränderung gegeneinander aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade gezogen. Eine weitere Linie gab die Werte an, bei denen

$V_{ED} = V_{ES}$ ist, d.h. dass die Herzkammer blutleer ist. Der Schnittpunkt dieser beiden Linien ergibt den Korrekturwert (V_p ; Abb. 19), welcher vom Gesamtvolumen abgezogen werden muss.

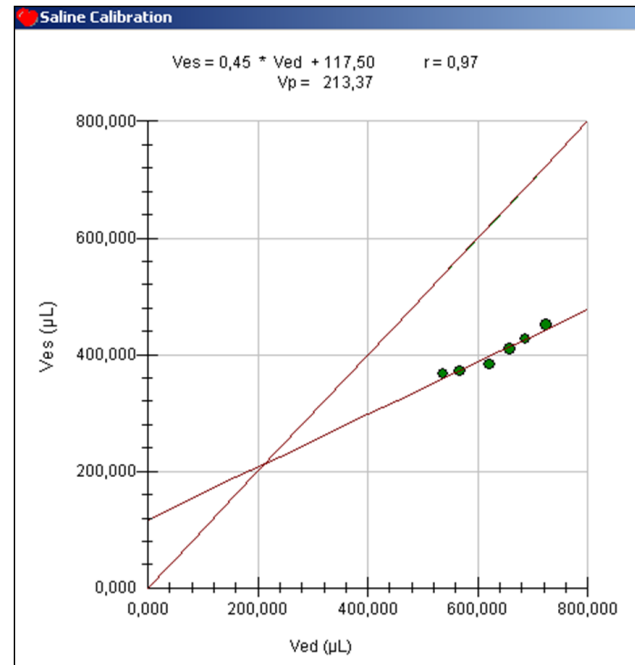


Abb. 19: Graphische Darstellung der Parallel-Konduktanz Berechnung mit PVAN. Der Schnittpunkt der beiden Geraden ergibt das Parallel-Volumen (V_p), das vom gesamten Volumen abgezogen werden muss, um das „echte“ Blutvolumen im linken Ventrikel zu erhalten. Repräsentatives Beispiel einer „saline calibration“.

3.4.6 Intravenöse Injektion von Physostigmin und Stimulation des *Nervus vagus*

Für die Versuche mit dem Acetylcholinesteraseinhibitor Physostigmin (Anticholinum®; Gruppe 3) wurde 5 Minuten vor LPS-Gabe ein Bolus (80 µg/kg KG Physostigmin; 400 µg/ml Stock-Lösung) i.v. über 1 min appliziert. Nach der LPS-Injektion erfolgte eine stetige Infusion (12,5 µg/kg/h KG).

Für die Stimulationsversuche wurde der Vagusnerv vorsichtig freipräpariert und in die Stimulationselektrode eingeklemmt (Abb. 20 A und B). Zum Schutz vor Austrocknung wurde der Nerv mit Paraffinöl bedeckt und danach distal mit einer Ligatur versehen, die mit einem Nadelhalter auf Zug gehalten wurde. Oberhalb dieser Ligatur wurde der Nerv durchtrennt, um eine rückwärtige Stimulation des Gehirns auszuschließen.

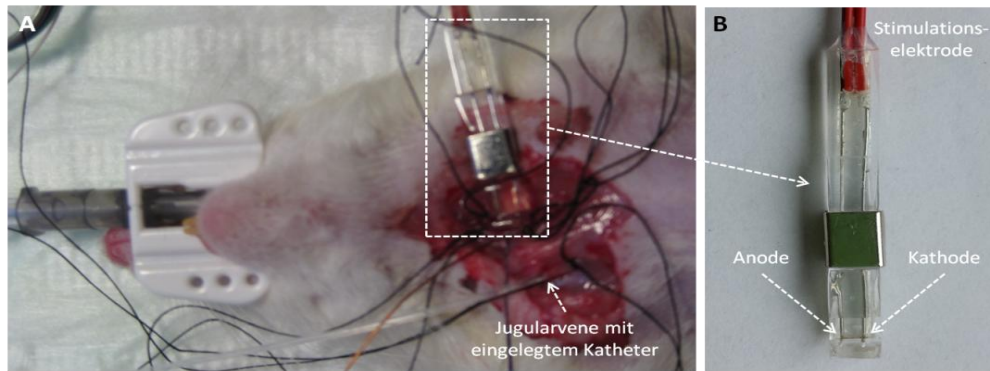


Abb. 20: Anbringen der Stimulationselektrode an den *Nervus vagus*. Für die Stimulationsversuche wurde der Vagusnerv einer intubierten und vollkatheterisierten Ratte (A) in eine Stimulationselektrode eingeklemmt (B).

Die Stimulation wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 5 V mit 2 ms Pulslänge und einer Frequenz von 1 Hz über 2 Minuten (Gruppe 5) jeweils 1 Minute vor und nach LPS-Bolus oder 20 Minuten (Gruppe 6), beginnend 5 Minuten vor dem LPS-Bolus. Die Stimulationseinstellungen wurden so gewählt, dass das freigesetzte Acetylcholin seine immunsupprimierende Wirkung ausüben konnte, jedoch nicht die Herzfrequenz beeinflusste.

3.4.7 Auswertung

Die Auswertung der Druck/Volumen-Kurven erfolgte offline mit der PVAN Ultra[®] Analyse Software (Version 1.1). Dazu wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten (t_0 , $t_{0.5}$, t_1 etc.) ca. 8 Schleifen in LabChart markiert, exportiert und mit einem weiteren Programm (MPUCU2PV, Version 1.6a) in PVAN-kompatible Daten konvertiert. Aus den exportierten Daten konnten nun verschiedene Parameter ermittelt werden:

- Herzfrequenz (HF): Anzahl der Herzschläge pro Minute [1/min] oder [bpm]
- *Cardiac Output* (CO, Herzzeitvolumen): Berechnet sich durch die Multiplikation der Herzfrequenz mit dem Schlagvolumen ($HF \times SV = CO$) und gibt das gesamte Blutvolumen an, das vom linken Ventrikel pro Minute ausgeworfen wird [ml/min].
- Ejektionfraktion (EF): Anteil des vom Herzen ausgeworfenen Blutes im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Blutes des Ventrikels [%]

3.5 Arbeiten mit RNA

Vor dem Arbeiten mit RNA wurden der Arbeitsplatz sowie die Pipetten und andere verwendete Materialien mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Für die Pipettierarbeiten wurden ausschließlich Filterspitzen verwendet.

3.5.1 Isolation RNA

Die RNA-Isolation aus dem Herzgewebe erfolgte aus einem 50 mg - 100 mg tiefgefrorenen Ventrikelstück. Das Gewebestück wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml TRIzol-Lösung versetzt. Mit Hilfe einer Mahlkugel wurde das Gewebe für 2 mal 3 Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz in der Schwingmühle homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde für 15 Sekunden gevortext und nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch kam es zu einer 3-Phasen-Bildung. Die untere rötliche Phase enthielt die DNA-Fraktion, die mittlere trübe Interphase die Proteine. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die beiden anderen Phasen wurden verworfen und in dem entsprechenden Abfall entsorgt. Um die RNA auszufällen, wurde langsam 1 VT 70 %iger Ethanol hinzupipettiert und gemischt.

Auf eine RNeasy[®]-Säule wurden dann 700 µl der Probe geladen und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nun nach Angaben des Handbuches für das Qiagen RNeasy[®] Mini Kit plus mit den im Kit enthaltenen Lösungen und Puffern, dessen Prinzip auf der selektiven Bindung von RNA an eine Silikon Gel Membran beruht. Zum Schluss wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der gewonnen RNA wurde mit Hilfe eines Photometers und einer Ultra-Mikromesszelle bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde durch das Verhältnis von E260/E280 die Reinheit der RNA ermittelt. Für reine RNA lag die Ratio um 2,0. Kleinere Werte wiesen auf Kontaminationen mit Proteinen und Phenol hin.

Alle Arbeiten wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe bestimmter Enzyme, sog. Reverser Transkriptasen, kann aus RNA einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Die cDNA kann nun als Template in einer PCR-Reaktion fungieren und es können Rückschlüsse auf die Expression bestimmter Gene geschlossen werden. Jeweils 0,5 µg der isolierten RNA wurde mit dem QuantiTect® *Reverse Transcription* Kit in cDNA im PCR-Cycler umgeschrieben. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers im Handbuch. Im ersten Schritt wurden eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA (gDNA) beseitigt. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription.

Die Reverse Transkriptase-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Komponenten	Menge	
gDNA Wipeout Puffer (7x)	2 µl	} Elimination der gDNA
Template RNA	0,5 µg	
RNase-freies Wasser	ad 14 µl	
→ Inkubation: 2 Minuten, 42 °C		
Reverse Transkriptase (RT)	1 µl	} Reverse Transkription
RT-Puffer (5x)	4 µl	
RT Primer Mix	1 µl	
→ Inkubation: 15 Minuten, 42 °C		
→ Inkubation: 3 Minuten, 95 °C		} Inaktivierung der RT

Von der cDNA wurde im Anschluß entweder ein 1 µl in die qRT-PCR eingesetzt oder die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Sie besteht aus drei Reaktionsschritten, die sich mehrfach zyklisch wiederholen: Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Synthese. Die einzelnen Reaktionsschritte sind an bestimmte Temperaturbereiche gekoppelt. Die Bestandteile eines PCR-Ansatzes sind: Eine DNA-Matrize, zwei Primer, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu vervielfältigten Sequenz sind, und eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Im ersten Schritt (Denaturierung) erfolgt die Trennung der zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 94 °C in Einzelstränge. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die DNA an (Annealing). Dieser Schritt erfolgt bei einer für die Primer spezifischen Temperatur (um 60 °C). Die DNA-Polymerase kann nun im dritten Schritt, ausgehend vom 3'-OH-Ende der Primer, komplementäre Stränge synthetisieren. Die Elongation erfolgt bei 72 °C, was dem Temperaturoptimum der Polymerase entspricht. Die Dauer eines PCR-Zyklus ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes.

3.6.1 TaqMan® *Real-Time* PCR

Die TaqMan® *Real-Time* PCR (Abb. 21) ist eine Methode (Holland et al. 1991) mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden zur direkten Detektion und Quantifizierung von PCR-Produkten in Echtzeit (*real-time*).

Während jedes PCR-Zyklus werden Fluoreszenzmessungen erfasst, wobei das Signal der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe proportional mit der Menge an PCR-Produkt zunimmt. TaqMan®-Sonden sind DNA sequenzspezifische Oligonukleotide, die an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierendem Reporterfarbstoff (FAM) gekoppelt sind und am 3'-Ende einen Quencher (TAMRA) besitzen. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird bei einer intakten Sonde die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt

(FRET; Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer). Lagert sich die Sonde an die Zielsequenz an, so wird sie aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert und es kann eine steigende Emission der Reporter-Fluoreszenz detektiert und graphisch dargestellt werden.

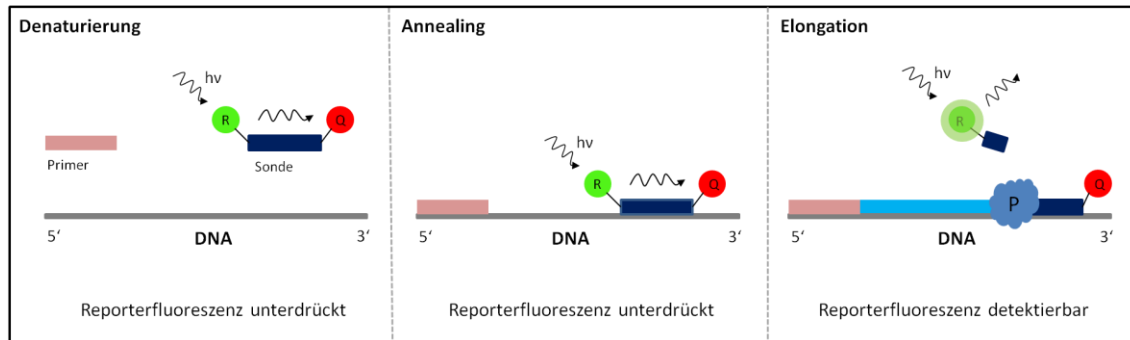


Abb. 21: Das Prinzip der TaqMan[®]-Sonden PCR. Nach Anlagerung der Sonde wird diese durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase (P) abgebaut. Dadurch entfernt sich der Reporter (R) vom Quencher (Q). Die Fluoreszenzemission des Reporters, die vorher durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt wurde, kann nun erfasst werden (modifiziert nach Koch 2004).

Die in dieser Arbeit verwendeten TaqMan[®]-Sonden (Assays) sind im Kapitel 2.6 aufgeführt. Folgende Komponenten wurden für einen Einzelansatz zusammenpipettiert:

Komponenten	Volumen
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	10 µl
Assay (Primer-/Sondengemisch)	1 µl
DNA (cDNA aus RT-Ansatz)	1 µl
DEPC-Wasser	8 µl
	<hr/> 20 µL

Alle Proben wurden als Dreifachbestimmung auf eine 96iger PCR-Reaktionsplatte pipettiert. Die Platte wurde anschließend mit einer optischen Folie versehen und kurz abzentrifugiert.

Das Standardprotokoll der TaqMan® *Real-Time* PCR wurde mit dem StepOnePlus™ Thermocycler wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	50	120	} 1 x
	95	60	
<u>Amplifikation</u>			
Denaturierung	95	15	} 40 x
Annealing und Elongation	60	60	

Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, mit der eine relative quantitative Aussage über den mRNA Gehalt in den verschiedenen Proben bezüglich des Zielgens gemacht werden konnte. Dazu wurden die Differenzen der C_t -Werte des jeweiligen Referenzgens mit den Differenzen der C_t -Werte des jeweiligen Zielgens dieser Proben verrechnet. Folgende Formel wurde angewandt: $2^{-\Delta\Delta C_t} = U$, wobei U den relativen Unterschied der verglichenen Proben darstellt. Um die Streuung der Werte innerhalb der Kontrollgruppe in Bezug auf die anderen Gruppen zu berücksichtigen, wurde die Statistik über die ΔC_t -Werte ($2^{-\Delta C_t}$) erstellt.

3.7 Arbeiten mit Proteinen

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Es wurden weiterhin sterile Lösungen und Geräte benutzt.

3.7.1 Proteinisolation aus Herzgewebe

Um Proteine aus dem Ventrikelgewebe zu isolieren und für ELISA-Analysen zu verwenden, wurde ein HEPES-Puffer angesetzt. In ein 2 ml Eppendorfgefäß wurde ein

ca. 50 mg - 100 mg gefrorenes Gewebestück eingewogen und dazu 1 ml HEPES-Puffer gegeben. Danach wurde das Gewebe mit Hilfe einer Mahlkugel in der Schwingmühle für 2 mal 3 Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurde die Proteinsuspension bei 4500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt die isolierten Proteine.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCATM Protein Assay Kits (Thermo Scientific) bestimmt. Das Prinzip des Assays basiert auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch Bicinchoninsäure (BCA; Smith et al. 1985), die durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) hervorgerufen wird. Die Durchführung der Proteinbestimmung für das Messen in Mikrotiterplatten erfolgte nach den Angaben des Herstellers im Handbuch. Die Proteinproben wurden zuvor 1:10 mit HEPES-Puffer verdünnt. Die Standardreihe wurde mit vorverdünnten Albumin-Standards (BSA Set Pre-Diluted Protein Assay Standards, Thermo Scientific) in einem Bereich von 125 µg/ml bis 2000 µg/ml erstellt. Proben und Standards wurden jeweils in Doppelbestimmungen aufgetragen. Die Extinktionen wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm im Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentrationen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Das isolierte Protein wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

HEPES-Puffer

HEPES 20 mM

EDTA 1,5 mM

pH 7,4

Die Lagerung des steril filtrierten Puffers erfolgte bei 4 °C. Vor Gebrauch wurde zu je 10 ml Puffer eine Protease-Inhibitor Tablette (Complete Mini, Roche) gegeben und darin gelöst.

3.7.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Proteinbestimmung von IL-1 β (RLB00) und TNF- α (RTA00) im Plasma und Ventrikelgewebe erfolgte durch die Verwendung von Quantikine[®]-ELISA Kits (R&D Systems GmbH) für Ratte. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Bindungsfähigkeit eines bestimmten Antigens an spezifische Antikörper (Antigen-Antikörper-Reaktion). Der in dieser Arbeit verwendete Sandwich-Immunoassay diente zur direkten quantitativen Bestimmung von IL-1 β und TNF- α . Ein für das jeweilige Zielprotein-spezifischer, monoklonaler Antikörper wurde auf einer 96-Well Polystyrol-Mikrotiterplatte fixiert (erfolgte durch den Hersteller). Standards, Leerwert, Proben und Positivkontrolle (im Kit enthalten) wurden jeweils als Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. Proben für die IL-1 β Bestimmung wurden zuvor 1 : 2, Proben für die TNF- α Bestimmung 1 : 2 mit der im Kit enthaltenen Kalibrier-Lösung verdünnt. Während einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Bindung des Proteins an die immobilisierten Antikörper. Mit dem anschließenden Waschen (5 Zyklen) im Mikroplatten-Wascher wurden die restlichen, nicht gebundenen Proteine entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Konjugationslösung, die einen für das Zytokin-spezifischen, polyklonalen-peroxidasegekoppelten Antikörper enthielt. Nach einer weiteren 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte wiederum 5-maliges Waschen, um ungebundene Antikörper zu beseitigen. Anschließend wurde die Substratlösung auf die Platte gegeben. In einer 30-minütigen Inkubation erfolgte der Abbau des Substrates, welcher zu einer Blaufärbung der Proben führte. Im Anschluss wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Die Proben färbten sich gelb mit der Farbintensität proportional zu dem im ersten Schritt gebundenen Zielprotein. Zum Schluss wurde die optische Dichte mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm gemessen. Anhand der Standardkurve wurde die Konzentration von IL-1 β und TNF- α mittels Software (Gen5TM) errechnet.

Die Durchführung des ELISAs entsprach den Herstellerangaben im Handbuch. Bei der Proteinbestimmung aus Geweben wurde das gemessene Protein gegen das Gesamtprotein normalisiert.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software Graphpad Prism (Version 5.0f für Mac). Als statistischer Test für die Varianzanalyse wurde das ANOVA-Verfahren („*analysis of variance*“) angewendet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis Test mit anschließender Anwendung des Dunn's Test berechnet.

Die Überlebensraten wurden nach Kaplan-Meier beschrieben und durch den „Log-rank“-Test verglichen.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. p-Werte unter ($p < 0,05$) wurden als signifikant (*) bezeichnet, $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) als hochsignifikant.

4 Ergebnisse

Ausgehend von der Beobachtung, dass Acetylcholin proinflammatorische Zytokinlevel unter Endotoxin-induzierten Bedingungen *in vivo* und *in vitro* (Borovikova et al. 2000b) vermindern kann, wurden in der vorliegenden Arbeit experimentelle Untersuchungen zum Einfluss cholinergischer Stimulation auf die Herzfunktion in der Endotoxinämie durchgeführt.

4.1 Etablierung des Tiermodells

Die Präparationstechnik sowie das Einlegen der Katheter wurden an 30 Ratten etabliert. Dabei wurde nach den Beschreibungen des Katheter-Modells von Pacher mit der „*closed-chest*“ Methode (Pacher et al. 2008) vorgegangen.

Für die Anästhesie wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran gewählt, da es im Vergleich mit Injektionsnarkosen zu einer geringeren Beeinflussung der Herzfunktion kommt. Isofluran ermöglichte zusätzlich eine Anästhesie mit chirurgischer Toleranz von mehreren Stunden unter guter Steuerbarkeit. Die Inhalationsnarkose bot weiter die Möglichkeit, die Tiere an die maschinelle Beatmung anzuschließen. Dafür war eine endotracheale Intubation nötig, deren Durchführung für eine ungeübte Person zunächst schwierig, aber für die lange Dauer des Experimentes unerlässlich war. Als Tubus diente zu Beginn der Experimente eine Venenverweilkanüle mit der Größe 14 G. Diese erwies sich jedoch als zu groß, so dass auf eine kleinere Kanüle mit der Größe 16 G gewechselt wurde. Zur Analgesie wurde der Opiatagonist Fentanyl i.v. verabreicht. Dieser zeigt einen raschen Wirkeintritt, besitzt jedoch in der Ratte nur eine kurze Wirksamkeit. Aus diesem Grund erfolgte über die gesamte Dauer des Experiments eine stetige Infusion von 10 µg/kg/h Fentanyl. Diese Konzentration war für die analgetische Wirksamkeit ausreichend. Zusätzlich wurde zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes Ringerlösung i.v. verabreicht (10 ml/kg KG/h).

In der folgenden Tabelle (Tab. 2) sind die hämodynamischen Messungen und die rektale Temperatur der 6 Kontrolltiere als Mittelwerte über die Gesamtdauer des Experimentes aufgeführt.

Tab. 2: Hämodynamik- und Temperaturmessungen der Kontrolltiere unter Isofluran-narkose über einen Versuchszeitraum von 6 h. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; n = 6.

	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6
HF [1/min]	361 \pm 10	355 \pm 25	346 \pm 24	338 \pm 30	332 \pm 31	324 \pm 26	317 \pm 22
art. Druck [mmHg]	77 \pm 7	69 \pm 14	63 \pm 9	60 \pm 8	57 \pm 8	54 \pm 10	49 \pm 11
CO [ml/min]	96 \pm 25	99 \pm 33	95 \pm 29	93 \pm 23	94 \pm 20	100 \pm 23	104 \pm 21
EF [%]	58 \pm 10	57 \pm 13	53 \pm 12	49 \pm 11	50 \pm 16	48 \pm 13	48 \pm 12
Temperatur [°C]	37,2 \pm 0,3	37,1 \pm 0,2	37,1 \pm 0,3	37,1 \pm 0,1	37,3 \pm 0,1	37,3 \pm 0,3	37,2 \pm 0,2

Die aufgelisteten Daten zeigen, dass sowohl die Herzfrequenz als auch der arterielle Blutdruck über den gesamten Versuchszeitraum hinweg absinken. Dabei bleibt die Herzfrequenz jedoch innerhalb der physiologischen Grenze von 250 – 500 /min (Erhardt et al. 2002). Der *Cardiac Output* bleibt bis Zeitpunkt t4 stabil und steigt danach leicht an. Die Ejektionsfraktion nimmt ab Zeitpunkt t3 leicht ab, liegt aber innerhalb bzw. leicht unter (bei t5 und t6) den Normwerten von 49 – 89 % (Pacher et al. 2008). Die rektale Temperatur konnte mit Hilfe der Heizmatte und der Wärmelampe konstant gehalten werden und lag im Bereich der normalen Körpertemperatur von 35,9 – 37,5 °C (Sharp und Regina 1998). Aufgrund der im Verlauf der Etablierungsversuche auch zeitlich verbesserten Präparationstechnik konnten 3 Tiere aus der Etablierungsphase mit in die Auswertung der Kontrolltiere übernommen werden.

Die Etablierungsversuche dienten, neben dem Erlernen der Präparationstechnik, auch dem Austesten verschiedener LPS-Konzentrationen. In den ersten Versuchen wurde ein 15 mg/kg LPS-Bolus i.v. injiziert. Da die Tiere mit Erhalt dieser Dosis jedoch frühzeitig verstarben, wurde die Konzentration langsam herabgesetzt. Erst Ratten, die mit der niedrigen Konzentration (1 mg/kg LPS) behandelt wurden, zeigten eine hämo-

dynamische Beeinträchtigung, jedoch mit einer für die Versuche sinnvollen Überlebensdauer.

Durch die Etablierungsversuche konnte gezeigt werden, dass eine stabile Narkose der Ratten über mehrere Stunden möglich ist. Für die Induktion der septischen Kardiomyopathie musste eine niedrige LPS-Konzentration gewählt werden, um ein zu frühes Versterben der Versuchstiere zu vermeiden.

4.2 Überleben und Mortalität

Durch die Injektion von bakteriellem Endotoxin (LPS) wurde ein systemischer Schockzustand ausgelöst, der das Krankheitsbild einer „septischen Kardiomyopathie“ wiedergeben sollte.

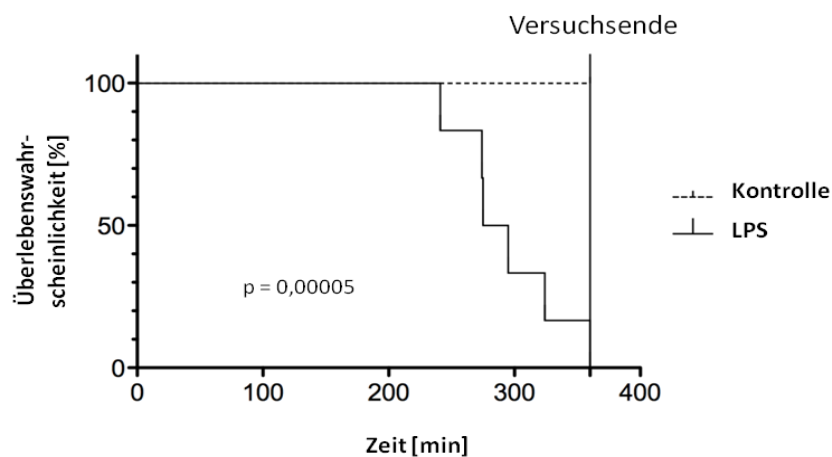


Abb. 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Kontrolltiere und der mit LPS-behandelten Ratten. Nach 6 stündiger Versuchsdauer betrug die Überlebensrate der Kontrolltiere (n = 6) 100 %, die Überlebensrate der mit LPS (1 mg/kg) behandelten Tiere (n = 6) 16,7 %.

Die unbehandelten Kontrollratten (Gruppe 1) wiesen eine Überlebensrate von 100 % über den gesamten Versuchszeitraum von 6 Stunden (= 360 min) auf. Tiere, die eine LPS-Injektion erhielten (Gruppe 2), verstarben bis auf eine Ratte vor Ende des Experimentes (Überlebensrate 16,7 %). Von den 6 Tieren überlebten alle den Zeitpunkt t4 (= 240 min), 4 Ratten starben vor dem Zeitpunkt t5 (= 300 min) und eine weitere Ratte verstarb nach 324 min (Abb. 22).

Der Vergleich der beiden Kurven zeigt, dass das injizierte LPS einen Einfluss auf das Überleben der Versuchstiere hatte.

Um den Einfluss cholinergischer Stimulation in endotoxämischen Ratten zu untersuchen, wurde in den nächsten Experimenten der *Nervus vagus* der Versuchstiere elektrisch stimuliert. Dazu wurde der Nerv in die Stimulationselektrode eingeklemmt und danach oberhalb der Elektrode durchtrennt (vagotomiert; VGX), um eine rückwärtige Stimulation des Gehirns zu verhindern. Bei der Kontrollgruppe (VGX) erfolgte danach keine Stimulation.

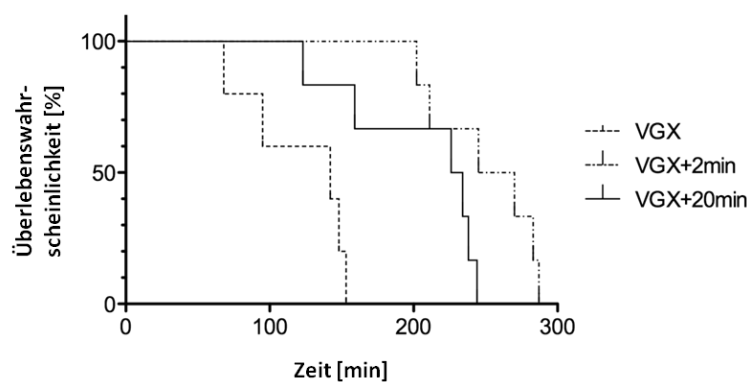


Abb. 23: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der endotoxämischen, vagotomierten sowie der kurz- und langfristig vagal stimulierten Ratten. Die Sterblichkeit der endotoxämischen, vagotomierten (VGX) Ratten ($n=5$) und auch die der Tiere mit Vagusstimulation für 2 min ($n=6$) und 20 min ($n=6$) betrug 100 %.

Alle 5 vagotomierten Ratten ohne Stimulation (Gruppe 4) starben frühzeitig vor Zeitpunkt t_3 (= 180 min) zwischen 68 min und 153 min. Die Überlebenszeit verlängerte sich mit Stimulation des Vagusnervs, dabei starben die Versuchstiere mit einer Stimulation von 20 Minuten (Gruppe 6) zwischen Zeitpunkt t_2 (= 120 min) und t_4 (= 240 min). Bei einer 2 minütigen Stimulation (Gruppe 5) verstarben die Tiere zwischen den Zeitpunkten t_3 (= 180 min) und t_5 (= 300 min) (Abb. 23).

Die Überlebenszeit von vagotomierten Ratten mit LPS-Injektion war im Vergleich zu endotoxämischen Ratten mit intaktem Vagusnerv deutlich reduziert (Tab. 3). Die elektrische Stimulation des *N. vagus* ermöglichte im Vergleich zu den unstimulierten Ratten ein längeres Überleben der Versuchstiere, wobei die kurzzeitige Stimulation von 2 Minuten den größten Effekt erzielte (Abb. 23). Die Stimulation bewirkte jedoch nicht,

dass das „Überlebens-Niveau“ der nicht vagotomierten LPS-Ratten wieder erreicht wurde.

Tab. 3: Vergleich der Überlebenszeiten von nicht vagotomierten und vagotomierten LPS-behandelten Ratten. Angegeben sind die Überlebenszeiten ab Injektion des LPS-Bolus in Minuten. LPS: (n = 6) und LPS + VGX: (n = 5).

	Ratte 1 Überleben [min]	Ratte 2 Überleben [min]	Ratte 3 Überleben [min]	Ratte 4 Überleben [min]	Ratte 5 Überleben [min]	Ratte 6 Überleben [min]
LPS	241	274	275	295	324	360
LPS + VGX	68	95	142	148	153	-

In weiteren Versuchen erfolgte die i.v.-Applikation eines Acetylcholinesteraseinhibitors in endotoxämische Ratten (Gruppe 3), um den Einfluss einer erhöhten endogenen Acetylcholinkonzentration zu untersuchen. Zum Einsatz kam ein als Medikament zugelassener Acetylcholinesteraseinhibitor (Anticholium[®], Wirkstoff: Physostigmin), der in der klinischen Routine zur Antagonisierung der anticholinergen Wirkung anderer Pharmaka (z.B. Antidepressiva, Narkotika) angewendet wird. In den Versuchen mit dem Acetylcholinesteraseinhibitor (n = 5) waren 60 % der Ratten, die Anticholium[®] i.v. (80 µg/kg KG Bolus und 12,5 µg/kg/h KG Infusion) erhielten, nach ca. 95 min verstorben. Nach der Injektion des Bolus kam es bei manchen Tieren zu einem erkennbaren Abflachen der Narkose mit spontaner Gegenatmung. In diesen Fällen wurde die Isoflurankonzentration für kurze Zeit erhöht, bis eine ausreichende Narkosetiefe wieder erreicht wurde. Da die Behandlung der Ratten mit Physostigmin zu einem sehr frühen Versterben führte, wurden weitere Versuche mit dem Acetylcholinesteraseinhibitor eingestellt. Es erfolgte ebenfalls keine Auswertung auf hämodynamischer sowie molekularbiologischer Ebene.

4.3 Hämodynamik des Herzens

Die hämodynamische Charakterisierung der Herzfunktion erfolgte durch die mit dem Millar-Katheter erhaltenen Druck/Volumen-Kurven. Dafür wurden ab dem Zeitpunkt t₀

alle 30 Minuten Messzeitpunkte festgelegt, mit denen im Anschluss des Versuches *offline* die Auswertung erfolgte.

4.3.1 Hämodynamische Funktion der Ratte unter endotoxämischen Bedingungen

Zum Zeitpunkt t_0 hatten alle Versuchstiere die gleiche Präparationsprozedur mit Saline-Kalibration durchlaufen und die entsprechenden Interventionen zur Aufrechterhaltung der Narkose, der Analgesie und des Flüssigkeithaushaltes erhalten. Der septische Schock wurde in den dafür vorgesehenen Gruppen durch die i.v.-Applikation von LPS ausgelöst. Mit der Injektion wurde kurz nach dem ersten Messpunkt (t_0) begonnen.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4) ist die Anzahl der Kontrolltiere (Gruppe 1) und die der LPS behandelten Ratten (Gruppe 2) aufgeführt, die zu einem bestimmten Messpunkt (t) noch lebten und in die Auswertung mit einbezogen wurden (siehe auch Kapitel 4.2, Abb. 22).

Tab. 4: Animals-at-risk. Die Tabelle gibt an, wie viele Tiere zu einem Zeitpunkt (t in h) noch lebten und in die Auswertung mit eingeschlossen wurden.

	t_0	$t_{0,5}$	t_1	$t_{1,5}$	t_2	$t_{2,5}$	t_3	$t_{3,5}$	t_4	$t_{4,5}$	t_5	$t_{5,5}$	t_6
Kontrolle $n =$	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
LPS $n =$	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	2	1	1

In den folgenden Abbildungen sind die hämodynamischen Parameter (Herzfrequenz, Blutdruck, *Cardiac Output* und Ejektionsfraktion) der Kontrolltiere und der mit LPS behandelten Tiere dargestellt.

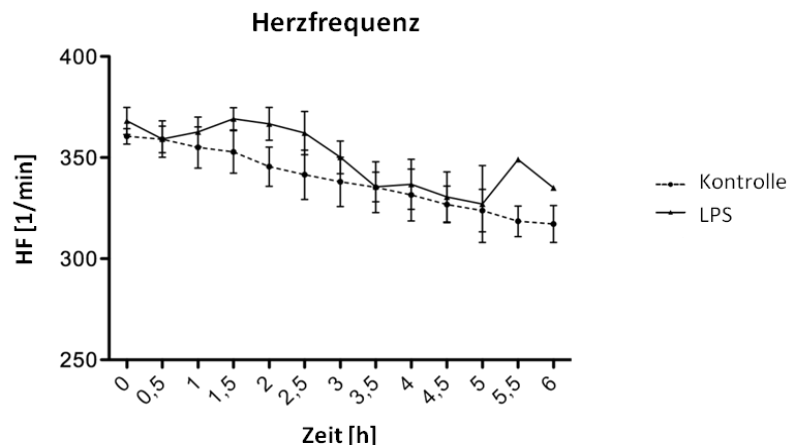


Abb. 24: Die Herzfrequenz der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren. Die Herzfrequenz (HF) zeigte einen Abfall der Werte über die gesamte Versuchsdauer sowohl bei den Kontrollratten als auch bei den endotoxämischen Tieren. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Kontrolle: $n = 6$, LPS: $n = 6$.

Die Herzfrequenz der Kontrolltiere fiel im Verlauf des Versuches leicht ab (t_0 : 361 /min \pm 10 /min, t_6 : 322 /min \pm 17 /min; Abb. 24 und Tab. 2). Bei den mit LPS behandelten Ratten war die Herzfrequenz 1,5 h nach Injektion des Bolus im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren leicht erhöht (LPS: 369 /min \pm 14 /min vs. Kontrolle: 353 /min \pm 26 /min). Ab dem Zeitpunkt $t_{3,5}$ sank die Frequenz wieder auf das Niveau der Kontrollratten ab (LPS: 336 /min \pm 18 /min vs. Kontrolle: 335 /min \pm 31 /min). Nach Zeitpunkt t_5 waren 5 der 6 LPS-Ratten verstorben. Bei den letzten Messpunkten $t_{5,5}$ und t_6 wies die verbliebene LPS-Ratte eine höhere Herzfrequenz (349 /min bzw. 335 /min) auf als die Ratten der Kontrollgruppe (317 /min \pm 22 /min).

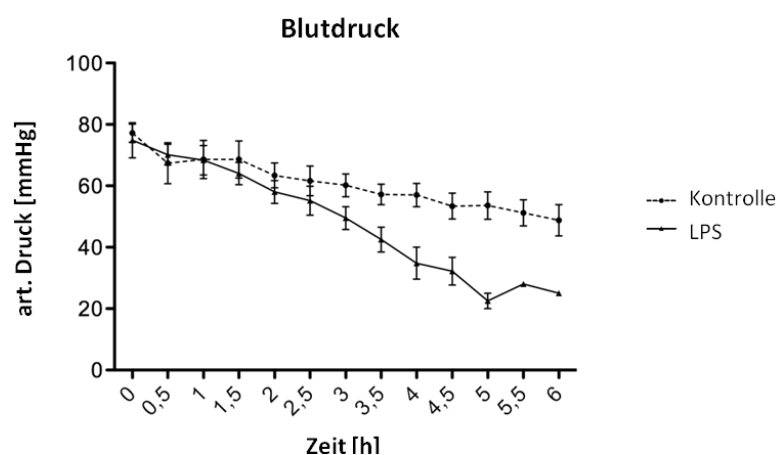


Abb. 25: Der arterielle Blutdruck der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren. Der arterielle Blutdruck, gemessen in der Schwanzarterie, zeigte eine Erniedrigung der Werte über die gesamte Versuchsdauer sowohl in den Kontrollratten als auch in den endotoxämischen Tieren. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Kontrolle: $n = 5$, LPS: $n = 6$.

Der arterielle Blutdruck der Kontrolltiere lag zu Beginn der Messungen im Mittel bei $77 \text{ mmHg} \pm 7 \text{ mmHg}$ (t_0) und sank im Verlauf der Experimente auf $49 \text{ mmHg} \pm 11 \text{ mmHg}$ (t_6) ab (Abb. 25 und Tab. 2). Der Druckabfall war bei den mit LPS behandelten Ratten stärker ausgeprägt. Die endotoxämischen Ratten zeigten bis zum Zeitpunkt $t_{2,5}$ einen ähnlichen Verlauf des Druckabfalls wie die Kontrolltiere. Ab dem Zeitpunkt t_3 konnte eine deutliche Erniedrigung des Druckes im Vergleich zu den Kontrollen (LPS: $50 \text{ mmHg} \pm 9 \text{ mmHg}$ vs. Kontrolle: $60 \text{ mmHg} \pm 8 \text{ mmHg}$) beobachtet werden. Der Druck fiel im folgenden Verlauf der Versuche weiter stark ab und lag ab Zeitpunkt t_4 durchschnittlich bei 35 mmHg (vgl. Kontrolle: $57 \text{ mmHg} \pm 9 \text{ mmHg}$). Bei der nach Zeitpunkt t_5 letzten überlebenden LPS-Ratte konnte während der beiden letzten Messungen lediglich noch ein Blutdruck von 28 mmHg ($t_{5,5}$) bzw. 25 mmHg (t_6) festgestellt werden.

Aufgrund eines Defekts im Tip-Katheter für die Druckmessung in der Schwanzarterie konnten nur 5 der eigentlich 6 Kontrolltiere in die Auswertung des arteriellen Blutdrucks einbezogen werden.

Mit Hilfe der PVAN Analyse Software konnten weitere hämodynamische Parameter bestimmt werden (Abb. 26 und Abb. 27).

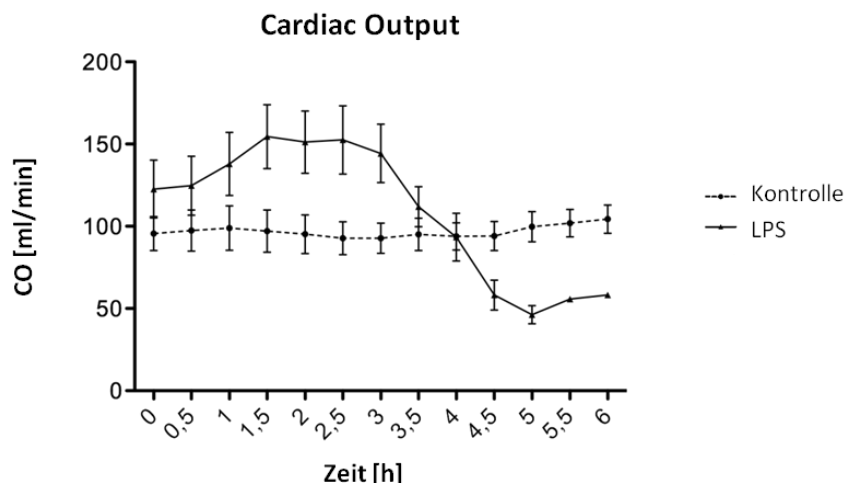


Abb. 26: Cardiac Output der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren. Der *Cardiac Output* (CO; Herzzeitvolumen) zeigte eine Beeinträchtigung durch die Verabreichung von LPS im Vergleich zu dem der unbehandelten Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Kontrolle: $n = 6$, LPS: $n = 6$.

Der *Cardiac Output* (Abb. 26) der Kontrollratten war über die gesamte Versuchsdauer hinweg stabil bzw. stieg nach dem Zeitpunkt t_4 leicht an (siehe Tab. 2,

t0: 96 ml/min \pm 25 ml/min, t6: 104 ml/min \pm 21 ml/min). Im Gegensatz dazu wiesen die LPS-Tiere einen deutlich anderen Verlauf auf. Der Basiswert bei t0 lag im Vergleich zu den Kontrollen bereits höher (LPS: 123 ml/min \pm 43 ml/min vs. Kontrolle: 96 ml/min \pm 25 ml/min). Außerdem stieg das Herzzeitvolumen eine Stunde nach LPS-Bolus an (von t0: 123 ml/min \pm 43 ml/min auf t1: 138 ml/min \pm 47 ml/min) und erreichte bei Zeitpunkt t1,5 den höchsten Wert mit 155 ml/min \pm 48 ml/min. Auf diesem Niveau verblieb das Herzzeitvolumen bis zum Zeitpunkt t2,5. Danach kam es zu einem deutlichen Absinken der Werte (t3: 144 ml/min \pm 43 ml/min, t4,5: 58 ml/min \pm 20 ml/min). Auch das Herzzeitvolumen der einzigen bis zum Versuchsende überlebenden LPS-Ratte war bei den letzten beiden Messpunkten niedriger (t5,5: 56 ml/min bzw. t6: 58 ml/min) als bei den Kontrolltieren (t5: 102 ml/min \pm 20 ml/min, t6: 104 ml/min \pm 21 ml/min).

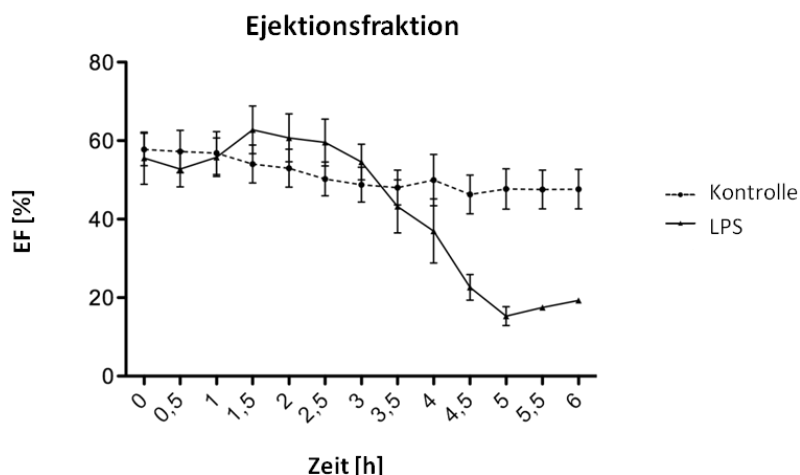


Abb. 27: Die Ejektionsfraktion der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren. Die Ejektionsfraktion (EF) zeigte durch die Verabreichung von LPS eine Beeinträchtigung im Vergleich zu der der unbehandelten Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Kontrolle: n = 6, LPS: n = 6.

Die Ejektionsfraktion (Abb. 27) der Kontrolltiere sank im Verlauf der Versuche leicht ab (t0: 58 % \pm 10 %, t6: 48 % \pm 12 %; siehe Tab. 2). Bei den mit LPS-behandelten Ratten war die Auswurfraction 30 Minuten nach Beginn der LPS-Injektion leicht reduziert (t0: 56 % \pm 16 %, t0,5: 53 % \pm 11 %), stieg danach aber über den Basiswert von t0 bis auf 63 % \pm 15 % (t1,5) an. Bis zum Zeitpunkt t2,5 (60 % \pm 15 %) sank die Ejektionsfraktion erneut leicht ab. Danach kam es zu einem starken Abfall (t3: 55 % \pm 11 % bis t4,5: 22 % \pm 7 %) mit einer deutlichen Reduzierung der Auswurfraction. Die Ejektionsfraktion der die komplette Versuchsdauer überlebenden

LPS-Ratte war im Vergleich mit den Kontrollen deutlich erniedrigt (t5,5: 18 % vs. 48 % \pm 12 % und t6: 19 % vs. 48 % \pm 12 %).

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigten, dass die Ratten durch das injizierte LPS eine Beeinträchtigung in der Hämodynamik erfahren. Der arterielle Blutdruck, der *Cardiac Output* und die Ejektionsfraktion wiesen beim Vergleich mit den Kontrolltieren deutlich veränderte Werte auf.

4.3.2 Hämodynamische Funktion endotoxämischer, vagotomierter Ratten unter elektrischer Stimulation des *Nervus vagus*

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob eine Stimulation des *Nervus vagus* einen positiven Einfluss auf die Hämodynamik in endotoxämischen Ratten hat. Dafür wurde in diesen Versuchsgruppen der rechte Vagusnerv durchtrennt (VGX; Gruppe 4) und in eine Stimulationselektrode eingeklemmt. Bei der Kurzzeitstimulation (VGX + 2 min; Gruppe 5) wurde jeweils eine Minute vor und nach der LPS-Injektion stimuliert. Bei der langzeitigen Stimulation (VGX + 20 min; Gruppe 6) wurde damit 5 Minuten vor der Applikation des LPS begonnen (siehe auch Kapitel 3.4.6).

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) ist die Anzahl der Versuchstiere aufgeführt, die bis zu einem bestimmten Messpunkt noch lebten und in die Auswertung mit einbezogen wurden (siehe auch Kapitel 4.2, Abb. 23).

Tab. 5: Animals-at-risk. Die Tabelle gibt an, wie viele Tiere zu einem Zeitpunkt (t in h) noch lebten und in die Auswertung mit eingeschlossen wurden.

	t0	t0,5	t1	t1,5	t2	t2,5	t3	t3,5	t4	t4,5	t5
VGX n =	5	5	5	4	3	-	-	-	-	-	-
VGX + 2 min n =	6	6	6	6	6	6	6	4	4	2	-
VGX + 20 min n =	6	6	6	6	5	5	4	4	1	-	-

In den folgenden Abbildungen (Abb. 28 bis Abb. 31) sind die hämodynamischen Parameter (Herzfrequenz, Blutdruck, *Cardiac Output* und Ejektionsfraktion) der endotoxischen, vagotomierten und zusätzlich stimulierten Ratten dargestellt.

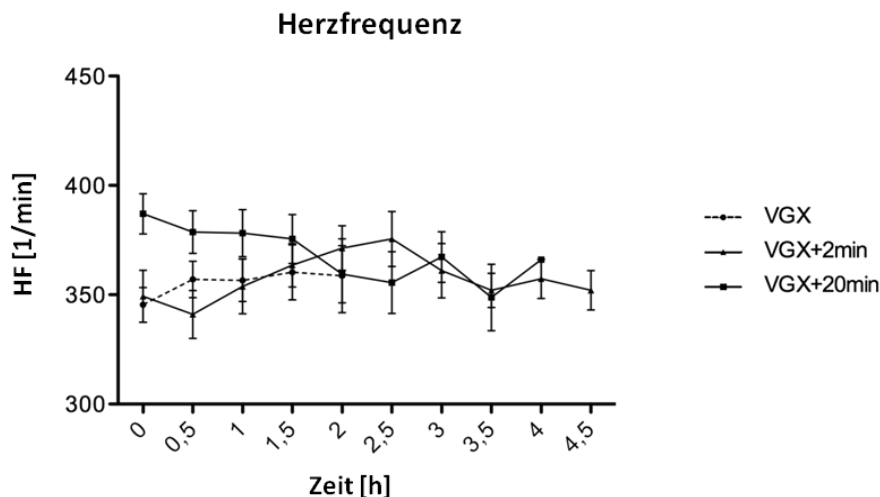


Abb. 28: Die Herzfrequenz von kurz- und langfristig stimulierten Ratten im Vergleich mit den unstimulierten Kontrolltieren. Die Herzfrequenz (HF) der nur vagotomierten (VGX) Ratten stieg leicht an, die HF der stimulierten Tiere (VGX + 2 min und VGX + 20 min) schwankte im Verlauf des Versuches. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. VGX: $n = 5$, VGX + 2 min: $n = 6$ und VGX + 20 min: $n = 6$.

Die Herzfrequenz (Abb. 28) der vagotomierten Ratten (VGX) stieg 30 Minuten nach Beginn der LPS-Injektion leicht an (t_0 : 345 /min \pm 18 /min, $t_{0,5}$: 357 /min \pm 19 /min) und fiel zum Zeitpunkt t_2 (351 /min \pm 36 /min) wieder ab. Nach 2 Stunden waren alle Ratten aus dieser Gruppe verstorben.

In der Gruppe mit einer 2-minütigen Stimulation (VGX + 2 min) schwankte die Herzfrequenz über die gesamte Versuchsdauer. Eine halbe Stunde nach Erhalt des LPS-Bolus fiel die Frequenz leicht ab (t_0 : 349 /min \pm 29 /min, $t_{0,5}$: 341 /min \pm 27 /min), stieg dann kontinuierlich bis zum Zeitpunkt t_3 (361 /min \pm 30 /min) an. Danach sank die Herzfrequenz der verbliebenen Tiere bis Zeitpunkt $t_{3,5}$ (352 /min \pm 16 /min) ab, war jedoch zum Zeitpunkt t_4 noch einmal leicht erhöht (357 /min \pm 18 /min) und fiel wiederum ab ($t_{4,5}$: 352 /min \pm 13 /min). Alle Tiere dieser Gruppe waren nach 4,5 Stunden verstorben.

Die Herzfrequenz bei den langfristig stimulierten Tieren (VGX + 20 min) war zu Beginn der Versuche im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht (t_0 : 387 /min \pm 22 /min), fiel bis zum Zeitpunkt $t_{1,5}$ (376 /min \pm 26 /min) leicht, danach jedoch stärker unter die

Herzfrequenz der kurzzeitig stimulierten Ratten ab (t_2 : $359/\text{min} \pm 29/\text{min}$ vs. $371/\text{min} \pm 25/\text{min}$). Zum Zeitpunkt t_3 stieg die Frequenz in etwa auf das Niveau der kurz stimulierten Tiere ($367/\text{min} \pm 23/\text{min}$ vs. $361/\text{min} \pm 30/\text{min}$) an und fiel danach wieder ab (t_3 : $349/\text{min} \pm 30/\text{min}$). Das letzte verbliebene Tier dieser Gruppe wies zum letzten Zeitpunkt eine Frequenz von $366/\text{min}$ (t_4) auf.

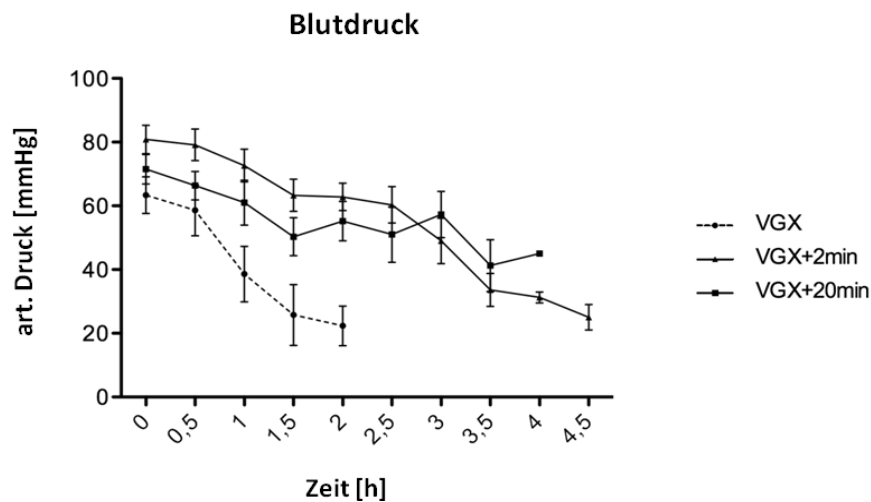


Abb. 29: Der arterielle Blutdruck von Kurz- und Langzeit stimulierten Ratten im Vergleich mit den nur vagotomierten Kontrolltieren. Der arterielle Blutdruck der Versuchstiere sank über die gesamte Versuchsdauer in allen Gruppen ab. Der stärkste Abfall war in den vagotomierten Ratten (VGX) zu beobachten. Gleich stark fiel der Druck in den stimulierten Tieren (VGX + 2 min, VGX + 20 min) ab. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. VGX: $n = 5$, VGX + 2 min: $n = 6$ und VGX + 20 min: $n = 6$.

Der arterielle Blutdruck der unstimulierten Kontrolltiere lag zu Beginn der Messungen um $64 \text{ mmHg} \pm 13 \text{ mmHg}$ (t_0) und sank im Verlauf der Experimente drastisch auf $22 \text{ mmHg} \pm 11 \text{ mmHg}$ (t_2) ab (Abb. 29).

Der Verlauf des Druckabfalles in den Stimulationsgruppen war abgeschwächer im Vergleich zu den nur vagotomierten Ratten. Bei den Tieren mit der 2-minütigen Stimulation des Vagusnervs lag der arterielle Druck zu Beginn der Versuche um $81 \text{ mmHg} \pm 11 \text{ mmHg}$ und sank nach Erhalt des LPS-Bolus und der Stimulation kontinuierlich ab. Dabei fiel der Druck bis zum Zeitpunkt $t_{2,5}$ ($60 \text{ mmHg} \pm 14 \text{ mmHg}$) langsam, danach stärker ab (t_3 : $49 \text{ mmHg} \pm 17 \text{ mmHg}$, t_6 : $25 \text{ mmHg} \pm 6 \text{ mmHg}$).

Der Blutdruck innerhalb der langfristig stimulierten Tiere sank bis zum Zeitpunkt $t_{1,5}$ kontinuierlich ab (t_0 : $72 \text{ mmHg} \pm 11 \text{ mmHg}$, $t_{1,5}$: $50 \text{ mmHg} \pm 15 \text{ mmHg}$). Danach schwankte der Druckverlauf, stieg zum Zeitpunkt t_3 wieder auf $57 \text{ mmHg} \pm 15 \text{ mmHg}$

an und fiel anschließend jedoch wieder ab ($t_{3,5}$: $41 \text{ mmHg} \pm 16 \text{ mmHg}$). Die bis zum Zeitpunkt t_4 noch lebende Ratte wies noch einen Druck von 45 mmHg auf.

Zusätzlich wurden mit der PVAN Analyse Software weitere hämodynamische Parameter bestimmt (Abb. 30 und Abb. 31).

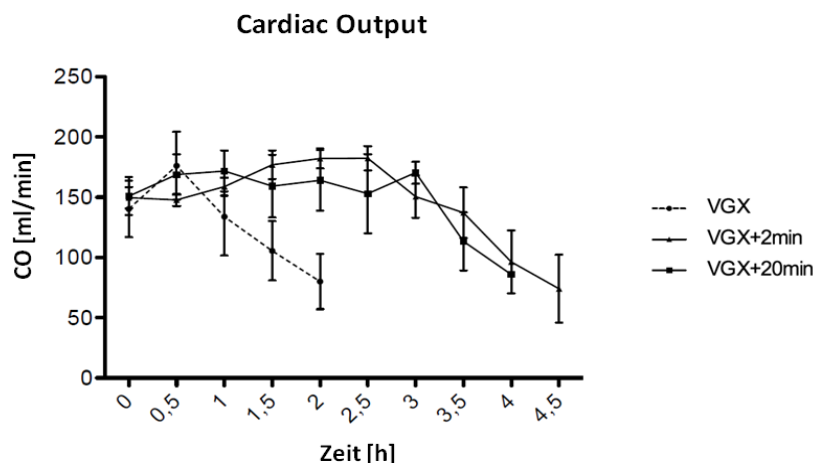


Abb. 30: Cardiac Output der stimulierten Ratten im Vergleich mit den ausschließlich vagotomierten Kontrolltieren. Der *Cardiac Output* (CO; Herzzeitvolumen) nimmt bei den vagotomierten Tieren (VGX) schnell ab. Bei den stimulierten Ratten kam es erst zu einem späteren Zeitpunkt zum Abfall der Werte (VGX + 2 min und VGX + 20 min). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. VGX: $n = 5$, VGX + 2 min: $n = 6$ und VGX + 20 min: $n = 6$.

Der *Cardiac Output* (Abb. 30) der vagotomierten Ratten stieg nach dem LPS-Bolus zum Zeitpunkt $t_{0,5}$ hin an (t_0 : $140 \text{ ml/min} \pm 53 \text{ ml/min}$, $t_{0,5}$: $176 \text{ ml/min} \pm 63 \text{ ml/min}$). Danach fiel das Herzzeitvolumen jedoch stark ab (t_2 : $67 \text{ ml/min} \pm 46 \text{ ml/min}$).

Bei den Versuchstieren, die eine kurze Stimulation erhielten, stiegen die Werte langsam bis zum Zeitpunkt $t_{2,5}$ an (t_0 : $150 \text{ ml/min} \pm 21 \text{ ml/min}$, $t_{2,5}$: $182 \text{ ml/min} \pm 20 \text{ ml/min}$), stagnierten dann kurzzeitig und fielen anschließend ab (t_3 : $182 \text{ ml/min} \pm 25 \text{ ml/min}$, $t_{4,5}$: $74 \text{ ml/min} \pm 40 \text{ ml/min}$).

In der Gruppe der Ratten mit langer Stimulation stieg das Herzzeitvolumen bis zum Zeitpunkt t_1 leicht an (t_0 : $151 \text{ ml/min} \pm 39 \text{ ml/min}$, t_1 : $171 \text{ ml/min} \pm 42 \text{ ml/min}$) und fiel bis zum Zeitpunkt $t_{2,5}$ ($153 \text{ ml/min} \pm 74 \text{ ml/min}$) ab. Danach kam es wieder zu einem Anstieg des *Cardiac Outputs* (t_3 : $170 \text{ ml/min} \pm 18 \text{ ml/min}$), der nach t_3 jedoch stark abfiel ($t_{3,5}$: $113 \text{ ml/min} \pm 48 \text{ ml/min}$). Bei der zuletzt verstorbenen Ratte lag das Herzzeitvolumen am Ende der Messung bei 86 ml/min (t_4).

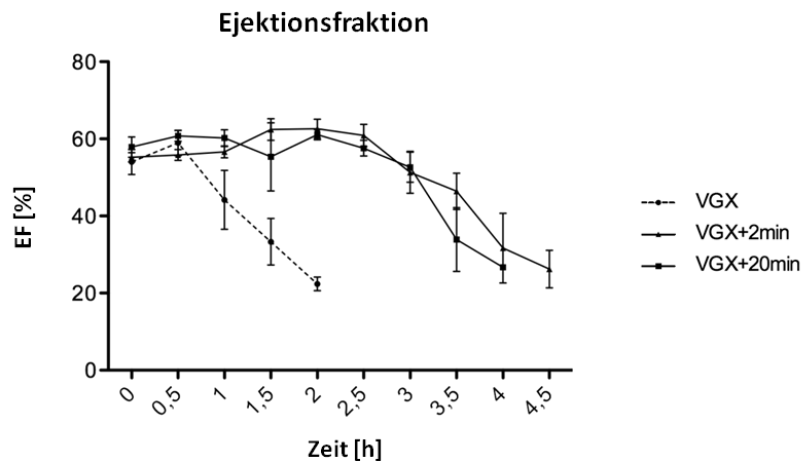


Abb. 31: Die Ejektionsfraktion der stimulierten Ratten im Vergleich mit den ausschließlich vagotomierten Kontrolltieren. Die Ejektionsfraktion (EF) nimmt bei den vagotomierten Tieren (VGX) schnell ab. Bei den stimulierten Ratten (VGX + 2 min und VGX + 20 min) kam es erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einem Rückgang der Auswurffraktion. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. VGX: $n = 5$, VGX + 2 min: $n = 6$ und VGX + 20 min: $n = 6$.

Die Ejektionsfraktion (Abb. 31) der vagotomierten Kontrollratten stieg nach der Gabe des LPS-Bolus leicht an (t_0 : $55 \% \pm 8 \%$, $t_{0,5}$: $59 \% \pm 9 \%$). Danach kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Auswurffraktion bis zum Zeitpunkt t_2 ($22 \% \pm 3 \%$).

Bei den kurz stimulierten Tieren blieb die Ejektionsfraktion bis zum Zeitpunkt t_1 stabil (t_0 : $55 \% \pm 3 \%$, $t_{0,5}$: $56 \% \pm 3 \%$ und t_1 : $57 \% \pm 4 \%$), stieg danach leicht an und lag dann konstant bei etwa 62% ($t_{1,5}$: $62 \% \pm 4 \%$, t_2 : $63 \% \pm 6 \%$ und $t_{2,5}$: $61 \% \pm 7 \%$). Hiernach war die Auswurffraktion herabgesetzt (t_3 : $51 \% \pm 13 \%$) und sank weiter bis auf $26 \% \pm 7 \%$ ($t_{4,5}$).

Die Ejektionsfraktion innerhalb der langfristig stimulierten Ratte war über 3 Zeitpunkte hinweg stabil (t_0 : $57 \% \pm 6 \%$, $t_{0,5}$ und t_1 : $60 \% \pm 4 \%$). Danach kam es bis zum Zeitpunkt $t_{2,5}$ ($48 \% \pm 21 \%$) zu einem leichten Abfall ($t_{1,5}$: $55 \% \pm 18 \%$ und t_2 : $56 \% \pm 11 \%$). Kurzzeitig stieg die Auswurffraktion wieder an (t_3 : $53 \% \pm 8 \%$), war aber kurz darauf deutlich reduziert ($t_{3,5}$: $34 \% \pm 17 \%$). Die Ejektionsfraktion der zuletzt lebenden Ratte lag bei 27% (t_4).

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass die Ratten unter endotoxämischen Bedingungen durch die Vagotomie und dem damit einhergehenden Verlust des vagalen Tonus eine deutliche Beeinträchtigung in ihrer Hämodynamik erleiden. Durch die Stimulation des Vagusnervs treten diese Effekte verzögert auf. Dabei scheint eine kurzzeitige Stimulation eine größere Wirksamkeit zu erzielen.

4.4 Molekularbiologische Ergebnisse

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden den Versuchstieren nach dem Experiment das gesamte Blutvolumen und das komplette Herz entnommen. Das Blut wurde nach der Abnahme zentrifugiert und das gewonnene Plasma anschließend eingefroren. Das Herz wurde in rechten und linken Ventrikel separiert und die Ventrikel weiter in 4–5 kleine Stückchen zerteilt. Diese wurden im sofortigen Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.4.1 Proteinspiegel proinflammatorischer Zytokine im Plasma und kardialen Gewebe

Mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) wurden die TNF- α und IL-1 β -Konzentrationen im Plasma (Abb. 32) und aus dem Gewebe des rechten und linken Ventrikels (Abb. 33 und Abb. 34) bestimmt. Diese proinflammatorischen Zytokine wurden aufgrund ihrer bedeutsamen Rolle in der Vermittlung pathophysiologischer Veränderungen in der Sepsis ausgewählt.

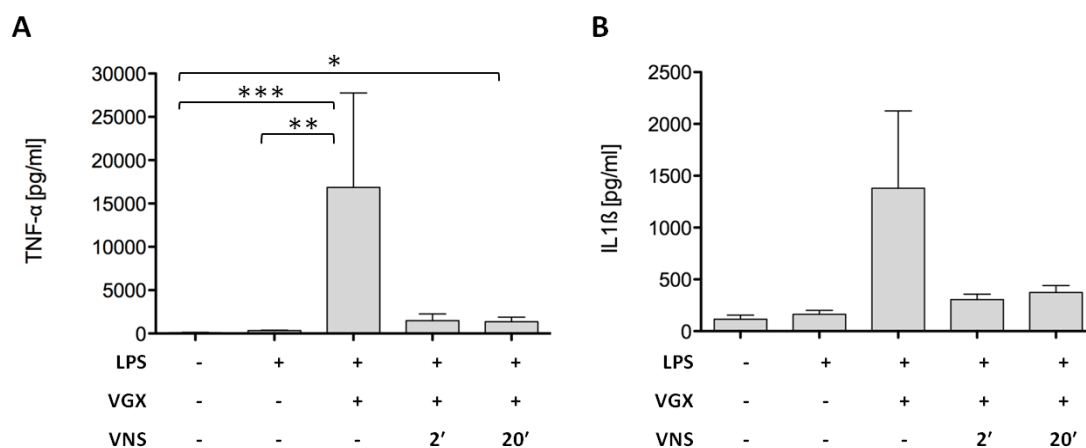


Abb. 32: Die Proteinkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Plasma der Ratten. Erhöhte TNF- α - (A) und IL-1 β - (B) Zytokinspiegel wurden in den vagotomierten Ratten (VGX) im Vergleich zu den Kontrollen (Kontrolle und LPS +) gemessen. Die Stimulation des Vagusnervs (VNS) bewirkte eine Reduzierung der beiden Zytokine. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** und $p < 0,001$ ***; $n \geq 5$).

Die Konzentration von TNF- α im Plasma (Abb. 32 A) lag bei den Kontrolltieren bei ca. 80 pg/ml. Durch die Injektion von LPS stieg der TNF- α -Spiegel auf 347 pg/ml \pm 85 pg/ml (LPS +). Bei den vagotomierten, endotoxämischen Ratten (LPS + VGX) war der TNF- α -Gehalt im Plasma signifikant erhöht (16867 pg/ml \pm 24336 pg/ml) im Vergleich zu der Kontroll- ($p < 0,001$) und LPS-Gruppe ($p < 0,01$). Durch die Stimulation des Vagusnervs wurden die TNF- α -Level reduziert (LPS + VGX + VNS 2': 1491 pg/ml \pm 1868 pg/ml und LPS + VGX + VNS 20': 1371 pg/ml \pm 1235 pg/ml, $p < 0,05$), lagen aber immer noch über den Werten der LPS-Ratten.

Ein ähnliches Muster ließ sich auch für die IL-1 β -Konzentration im Plasma (Abb. 32 B) feststellen. Der IL-1 β -Gehalt im Plasma der Kontrolltiere lag bei 115 pg/ml \pm 91 pg/ml. Durch den LPS-Bolus erhöhte sich der Spiegel leicht auf 163 pg/ml \pm 93 pg/ml (LPS +). Bei den Ratten, bei denen zusätzlich zur LPS-Injektion noch eine Vagotomie (LPS + VGX) durchgeführt wurde, war die IL-1 β -Konzentration um das 8-fache (1380 pg/ml \pm 1668 pg/ml) im Vergleich zur LPS-Gruppe erhöht. In den Stimulationsgruppen konnten, wie bei den TNF- α -Messungen, verringerte IL-1 β -Werte festgestellt werden (LPS + VGX + VNS 2': 304 pg/ml \pm 130 pg/ml und LPS + VGX + VNS 20': 375 pg/ml \pm 161 pg/ml), die jedoch über denen der Kontrolltiere lagen.

Es zeigte sich, dass durch die Vagotomie die Zytokinlevel im Plasma endotoxämischer Ratten beträchtlich erhöht waren. Die Stimulation bewirkte eine Reduzierung der Zytokinkonzentration mit dem niedrigsten Wert bei Tieren mit einer kurzen Stimulationsdauer. Diese lag jedoch immer noch deutlich über den Werten der Kontrolltiere.

Neben der Zytokinbestimmung im Plasma der Ratten wurde der TNF- α - und IL-1 β -Gehalt im ventrikulären Gewebe (Abb. 33 und Abb. 34) gemessen. Dazu wurden aus den Gewebestückchen das Gesamtprotein isoliert und mit Hilfe des BCA-Protein Assays bestimmt. Die im ELISA gemessene Proteinmenge wurde für die Auswertung gegen das Gesamtprotein normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test.

Im linken Ventrikel (Abb. 33 A) der Kontrolltiere konnte nahezu kein TNF- α nachgewiesen werden ($0,37 \pm 0,56$). Mit der Injektion von LPS stieg der TNF- α -Anteil leicht an ($0,88 \pm 0,88$; LPS +). Die höchsten TNF- α -Werte wurden in den endotoxämischen Ratten mit Vagotomie (LPS + VGX) gemessen (39 ± 53). Diese konnten

durch die Stimulation des Vagusnervs wieder reduziert werden (LPS + VGX + VNS 2': 6 ± 10 und LPS + VGX + VNS 20': 19 ± 32). Das Niveau der Kontrolltiere konnte durch die Stimulation jedoch nicht erreicht werden. Die kurze Stimulation erzielte die stärkste Erniedrigung der TNF- α -Werte.

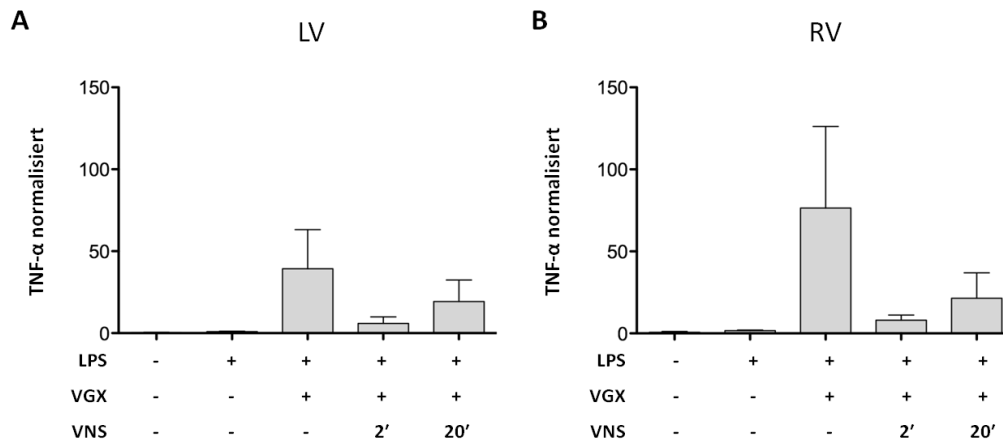


Abb. 33: Der Proteinanteil des proinflammatorischen Zytokins TNF- α im ventrikulären Gewebe der Ratten. Die TNF- α -Level waren sowohl im linken Ventrikel (LV; A) als auch im rechten Ventrikel (RV; B) der vagotomierten (VGX) Ratten erhöht. Durch die Stimulation des Vagusnervs (VNS) wurde der Gehalt an TNF- α im kardialen Gewebe reduziert. Das gemessene Protein wurde gegen das Gesamtprotein normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 5$.

Auch im rechten Ventrikel (Abb. 33 B) konnte TNF- α in den Kontrollratten nur in einem sehr geringen Anteil am Gesamtproteingehalt ($0,74 \pm 1,08$) festgestellt werden. Ratten aus der LPS-Gruppe wiesen einen geringfügig höheren Wert ($1,7 \pm 0,8$) auf. Ebenso wie im linken Ventrikel war der Anteil an TNF- α in den vagotomierten Ratten (LPS + VGX) stark erhöht (76 ± 111). Dieser konnte durch die Stimulation des Vagusnervs wieder reduziert werden (LPS + VGX + VNS 2': 8 ± 8 und LPS + VGX + VNS 20': 21 ± 38), auch hier mit einer deutlicheren Abnahme des TNF- α in der Gruppe der kurzzeitig stimulierten Versuchstiere.

Im linken Ventrikel (Abb. 34 A) der Kontrolltiere konnte kein IL-1 β nachgewiesen werden. Durch die Applikation von LPS wurde die Expression von IL-1 β induziert (20 ± 19 ; LPS +). In der Gruppe der vagotomierten Tiere (LPS + VGX) konnte nur ein geringer Anteil an IL-1 β (4 ± 7) gemessen werden. Im Gegensatz zu den TNF- α Bestimmungen stieg der Anteil an IL-1 β in den Gruppen der stimulierten Ratten bis auf das Drei- bzw. Zweifache (LPS + VGX + VNS 2': 63 ± 13 und LPS + VGX + VNS 20':

40 ± 20) im Vergleich zu dem der LPS-Ratten an. Der größte Wert wurde in der Gruppe mit kurzer Vagusstimulation gemessen. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war dieser signifikant ($p < 0,01$) erhöht.

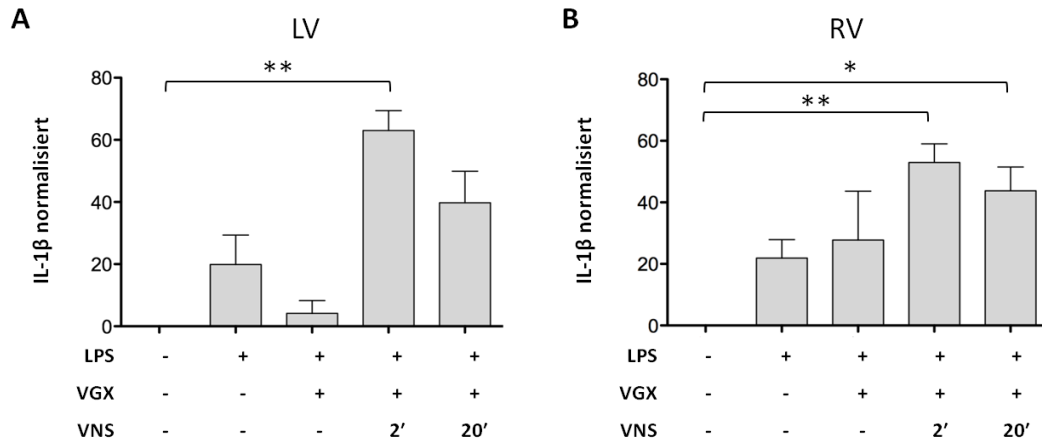


Abb. 34: Der Proteinanteil des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β im ventrikulären Gewebe der Ratten. Durch die Injektion von LPS konnten erhöhte IL-1 β -Level im linken (LV; A) und rechten (RV; B) Ventrikel gemessen werden. Ratten mit Stimulation des Vagusnervs (VNS) zeigten die höchsten IL-1 β -Level. Das gemessene Protein wurde gegen das Gesamtprotein normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** und $p < 0,001$ ***; LV: $n \geq 3$, RV: $n \geq 5$).

Ebenso wie im linken wurde auch im rechten Ventrikel (Abb. 34 B) keine Expression von IL-1 β in der Kontrollgruppe festgestellt. Bei den Tieren der LPS-Gruppe konnten erhöhte IL-1 β -Werte (22 ± 15 ; LPS +) nachgewiesen werden. Bei Ratten, die zusätzlich noch vagotomiert (LPS + VGX) wurden, stieg der Wert (28 ± 35) geringfügig an. Signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) erhöht, im Vergleich mit den Kontrollen, waren die IL-1 β -Werte der Stimulationsgruppen. Dabei wiesen Tiere mit einer kurzen Stimulation eine beinahe 2,5-fache Steigerung, Ratten mit der längeren Stimulation eine Verdoppelung des IL-1 β -Gehalts im Vergleich mit der LPS-Gruppe auf (LPS + VGX + VNS 2': 53 ± 15 und LPS + VGX + VNS 20': 44 ± 19).

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ergebnissen schien die elektrische Stimulation des Vagusnervs für die IL-1 β Expression im kardialen Gewebe keine reduzierende Wirkung zu besitzen.

4.4.2 Expression von TNF- α auf mRNA-Ebene

Für die folgenden qRT-PCR Versuche wurde aus dem linken und rechten Ventrikel RNA isoliert und jeweils 0,5 μ g dieser RNA in die anschließende cDNA Synthese eingesetzt. In der nachfolgenden qRT-PCR wurde dann 1 μ l der erhaltenen cDNA und die im Kapitel 2.6 aufgelisteten „TaqMan® Gene Expression Assays“ verwendet. Alle Primerpaare, die in den hier verwendeten Taq-Man Assays enthalten waren, überspannten laut Herstellerangaben mindestens ein Intron. So konnte eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Das Prinzip der TaqMan-Sonden PCR ist im Kapitel 3.6.1 aufgeführt. Um eine relative Quantifizierung der PCR zu ermöglichen, wurde als Referenz die Expression des β -Actin Gens gemessen. Alle erhaltenen Werte wurden nach der PCR gegen β -Actin normalisiert.

Um die TNF- α Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurden mittels qRT-PCR Untersuchungen im Hinblick auf die TNF- α Genexpression (Abb. 35) durchgeführt.

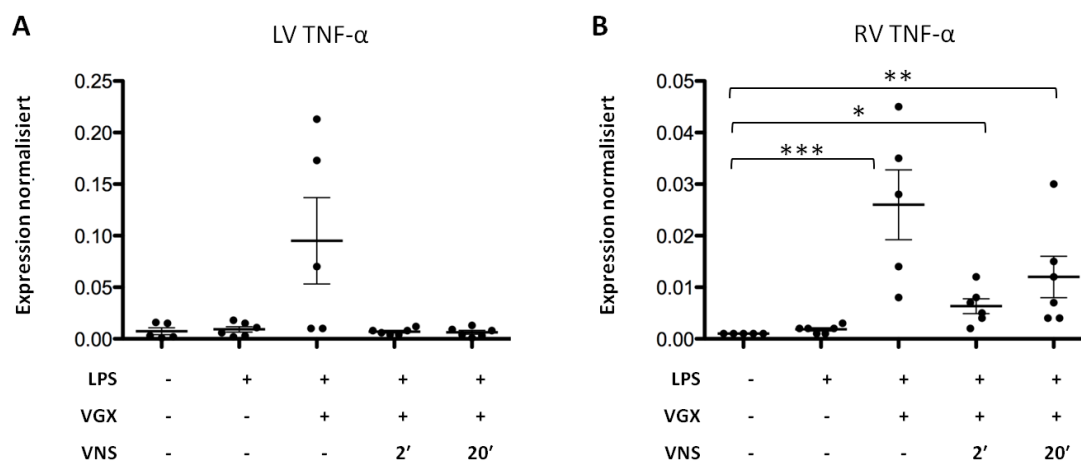


Abb. 35: Die mRNA-Expression von TNF- α im linken und rechten Ventrikel der Ratten.

Eine hochregulierte mRNA-Expression von TNF- α konnte bei den vagotomierten (VGX) Ratten sowohl im linken (LV; A) als auch im rechten (RV; B) Ventrikel nachgewiesen werden. Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet; gegen dieses erfolgte die Normalisierung der Expression. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** und $p < 0,001$ ***; $n \geq 5$).

Eine Hochregulation des TNF- α -Gens im linken Ventrikel (Abb. 35 A) im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte nur in den endotoxämischen und zusätzlich vagotomierten (LPS + VGX) Ratten beobachtet werden. Durch die Vagotomie stieg die mRNA-

Expression von TNF- α im Vergleich mit der LPS-Gruppe um das 10-fache an. Eine Zunahme der TNF- α mRNA-Expression in den anderen Gruppen war nicht erkennbar.

Im rechten Ventrikel (Abb. 35 B) war die mRNA-Expression von TNF- α in der Gruppe der vagotomierten Ratten (LPS + VGX) im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$). Die Expression war verglichen mit der LPS-Gruppe um das 13-fache gesteigert. Auch die mRNA-Expression in den Stimulationsgruppen (LPS + VGX + VNS 2' und LPS + VGX + VNS 20') war im Vergleich zu den Kontrollratten signifikant ($p < 0,05$ und $p < 0,01$) erhöht, lag jedoch um das Vier- bzw. Zweifache unter der Gruppe mit den nur vagotomierten Ratten.

Das Genexpressionsmuster entsprach somit der TNF- α -Bestimmung auf Proteinebene im rechten Ventrikel.

4.4.3 Acetylcholinsynthese im ventrikulären Gewebe (ChAT vs. CarAT)

Ausgehend von der Untersuchung, dass adulte Kardiomyozyten die Fähigkeit besitzen Acetylcholin zu produzieren (Rana et al. 2010), sollte mittels qRT-PCR die Expression von Acetylcholin-synthetisierenden Enzymen untersucht werden. Daher wurde in den darauffolgenden Experimenten die Genexpression der Cholinacetyltransferase (ChAT) untersucht. Dieses Enzym ist für Bildung von Acetylcholin aus Acetyl-CoA und Cholin in den Zellen verantwortlich.

Für die qRT-PCR Ansätze gegen das ChAT-Gen (TaqMan Assay: Rn01453446_m1) wurde sowohl die synthetisierte cDNA des linken als auch des rechten Ventrikels verwendet. Es konnte jedoch in keiner Probe der verschiedenen Versuchsgruppen eine Expression von ChAT detektiert werden. Daraufhin wurden die Versuche mit einem weiteren Assay (Rn01453442_m1, positiv getestet in (Rana et al. 2010)) wiederholt. Allerdings konnte auch mit diesem Assay keine Expression von ChAT festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass eine mögliche Synthese von Acetylcholin in den Ventrikeln nicht durch die Cholinacetyltransferase erfolgt. In einer früheren Studie konnten Slavikova und Tucek (1982) nachweisen, dass die ChAT-Aktivität in den Ventrikeln von Rattenherzen sehr gering ist. Ihren Untersuchungen nach wird das in den Ventrikeln nachweisbare Acetylcholin durch das Enzym Carnitinacetyltransferase (CarAT) gebildet. CarAT kann aus Acetylcarnitin frei-

gesetztes Acetyl-CoA zu Acetylcholin verarbeiten (Ayala 1995). Aufgrund der in dieser Studie gemachten Beobachtungen wurden die Versuche erneut wiederholt, diesmal jedoch im Hinblick auf die CarAT-Genexpression (Abb. 36).

Die mRNA-Expression von CarAT im linken Ventrikel (Abb. 36 A) war durch die Verabreichung von LPS (LPS +) im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht hochreguliert. Bei den zusätzlich vagotomierten Ratten war die Expression von CarAT im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt.

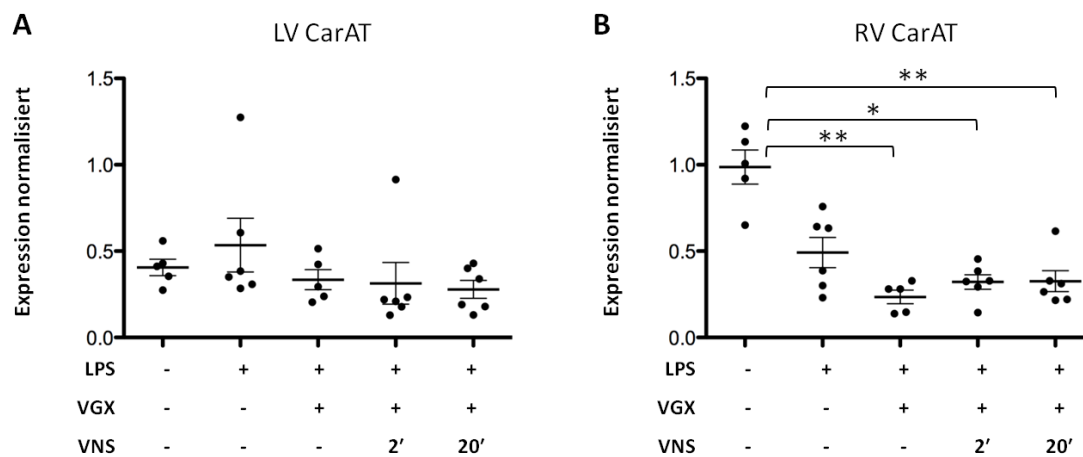


Abb. 36: Die mRNA-Expression von CarAT im linken und rechten Ventrikel der Ratten. Die Expression von CarAT wurde durch die Injektion von LPS im linken Ventrikel (LV; A) heraufreguliert. Im rechten Ventrikel (RV; B) war die CarAT-Expression in den endotoxämischen Ratten erniedrigt. Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet, gegen dieses erfolgte die Normalisierung der Expression. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Gruppenvergleich mit dem Dunn's-Post-Test. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** und $p < 0,001$ ***; $n \geq 5$).

Im rechten Ventrikel (Abb. 36 B) hingegen war die CarAT-Expression der Ratten mit LPS-Injektion (LPS +) im Vergleich zu der der Kontrolltieren halbiert. Die Expression in den vagotomierten LPS-Versuchstieren (LPS + VGX) war signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt. Eine hoch signifikant herunter regulierte Expression, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, konnte in den Stimulationsgruppen beobachtet werden (LPS + VGX + VNS 2': $p < 0,05$ und LPS + VGX + VNS 20': $p < 0,01$).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine mögliche Acetylcholinsynthese in den Ventrikeln von CarAT durchgeführt werden könnte und dass das Enzym nach Verabreichung von LPS im rechten Ventrikel herunter reguliert wird.

5 Diskussion

Die septische Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch eine erhebliche Beeinträchtigung der Herzfunktion in der Sepsis. Auch im septischen Rattenmodell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die in der Literatur beschriebene gestörte Hämodynamik klar erkennbar und führte darüber hinaus zu einem verfrühten Versterben der Versuchstiere während der Experimente.

Mit Hilfe eines Druck/Volumen-Katheters können linksventrikuläre Druck/Volumen-Kurven in Echtzeit aufgezeichnet werden und somit die hämodynamische Funktion innerhalb des Versuches bestimmt und bewertet werden. Durch die Entwicklung dieser Katheter im Miniaturformat ist es heutzutage möglich, diese Technik auch im Kleintiermodell anzuwenden. Der Katheter wird dabei direkt über die *A. carotis* in den linken Ventrikel der Ratte eingeführt und kann dort gleichzeitig den Druck und das Volumen von Herzschlag zu Herzschlag messen. Mit Anwendung dieses Systems konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Herzfunktion der Ratten durch eine i.v.-Verabreichung von LPS beeinträchtigt wird. Das Ausmaß dieser Funktionsstörung wird durch eine rechtsseitige zervikale Vagotomie bei den Ratten weiter verstärkt. Mittels ELISA wurden erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel im Plasma und im ventrikulären Gewebe der endotoxämischen Ratten, mit höchster Konzentration in der Vagotomie-Kontrollgruppe, gemessen. Mittels qRT-PCR Experimenten aus dem Herzgewebe konnten diese Ergebnisse durch eine gesteigerte Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α auch auf mRNA-Level bestätigt werden. Durch eine Stimulation des Vagusnervs wird der negativ wirkende Effekt der Funktionsstörung in der Hämodynamik bei Ratten mit Vagotomie verzögert. Dementsprechend ist auch eine niedrigere proinflammatorischen Zytokinexpression auf Protein- und mRNA-Ebene zu verzeichnen. Während ChAT mittels qRT-PCR im ventrikulären Gewebe nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine durch LPS herabgesetzte Expression von CarAT, das ebenfalls für die Synthese von Acetylcholin verantwortlich sein kann, ermittelt.

5.1 Die erfolgreiche Etablierung eines LPS induzierten septischen Kardiomyopathiemodells unter Anwendung des Millar-Konduktanzkatheters in narkotisierten Ratten

In der vorliegenden Arbeit sollten kardiale Funktionsparameter im septischen Schock mit gleichzeitiger Stimulation des Vagusnervs im Kleintiermodell an der Ratte charakterisiert werden. Dazu musste ein geeignetes septisches Tiermodell ausgewählt und an unsere Versuchszwecke angepasst werden.

Tiermodell

Derzeit existieren diverse standardisierte und in der Literatur beschriebene Tiermodelle, die das klinische Bild der Sepsis widerspiegeln sollen (Belikoff und Buras 2008). Die verschiedenen Modelle können in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden: (1) Die Verabreichung von Toxinen (z. B. LPS, Zymosan etc.), (2) die Verabreichung lebensfähiger Mikroorganismen (z. B. Bakterien) oder (3) die Perforation endogener Schutzbarrieren (z. B. die Darmperforation) (Buras et al. 2005).

Als Goldstandard wird dabei die „*cecal ligation and puncture*“-Methode (CLP), 1980 von Wichterman et al. entwickelt, angesehen (Wichterman et al. 1980). Sie gilt mittlerweile als das gebräuchlichste und weitverbreitetste Sepsismodell bei Nagetieren. Dabei wird die Bauchhöhle der Versuchstiere eröffnet, das Caecum mobilisiert und anschließend ligiert. Danach erfolgt eine Punktion, durch die der Stuhl aus dem Darmlumen in die Bauchhöhle austritt und somit eine polymikrobielle Sepsis auslöst. Der Vorteil dieses Modells besteht in seiner realistischen Art, eine Sepsis zu induzieren (Rittirsch et al. 2008) und hat somit eine hohe klinische Relevanz (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die schlechte Quantifizierbarkeit und somit die nicht einwandfreie Reproduzierbarkeit, denn die Dosis der Sepsis-verursachenden Erreger kann nicht genau bestimmt werden und es ist überdies schwierig, das Ausmaß der Sepsis zu kontrollieren (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Die Analyse der Herzfunktion während des septischen Schocks erfolgte hier mit Hilfe eines operativ in narkotisierte Ratten eingebrachten Druck/Volumen-Katheters. Bei der CLP-Methode lässt sich der Beginn einer veränderten Herzfunktion der Ratten kaum exakt bestimmen und kann laut Literatur zwischen zwei und zehn Stunden nach dem Eingriff liegen (Zhou et al. 1998). Damit wären das Narkotisieren der Tiere und das Einbringen

des Katheters zum richtigen Zeitpunkt kaum möglich gewesen. Zudem wäre ein negativer Einfluss der Narkose bei den durch die CLP gesundheitlich geschwächten Ratten denkbar gewesen.

Ein weiteres weit verbreitetes Modell in der Sepsisforschung ist das Endotoxin-Modell. Dieses Modell zeigt in Bezug auf die gestörte Herzfunktion eine „beschleunigte“ Verlaufsform, da ein typischer Anstieg des *Cardiac Outputs* während der hyperdynamen Phase bereits 30 bis 60 Minuten nach Injektion beobachtet werden kann (Abb. 26). Durch die Infusion von LPS werden lediglich einige Eigenschaften eines septischen Krankheitsverlaufes hervorgerufen, ein infektiöser Fokus besteht dabei nicht (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). LPS induziert über den TLR4 eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems (siehe auch Kapitel 1.1.3). Das Modell kann nicht vollständig die komplexen Strukturen im septischen Geschehen widerspiegeln, bietet jedoch vor allem durch seine einfache Durchführung sowie der guten Steuer- und Reproduzierbarkeit einige Vorteile. Es wird somit eher als eine Art Schockmodell angesehen, dabei wird der Schockzustand durch die schnelle Induktion von Zytokinen und dem Abfall der kardiovaskulären Funktionen hervorgerufen (Krukemeyer 2005). Durch niedrige LPS-Dosen kann in Ratten eine veränderte Hämodynamik induziert werden (Johnston et al. 1989), die auch in der humanen Sepsis zu beobachten ist. Obwohl auch die CLP-Methode, abgesehen von dem zeitlich beträchtlicheren Aufwand, aus hämodynamischer Sicht ein für uns angemessenes Modell darstellte, fiel die Entscheidung zugunsten des für unsere Versuchszwecke besser geeigneteren LPS-Modells.

LPS-Dosierung

Die ersten Versuche, bezüglich einer für die Experimente geeigneten LPS-Dosis richteten sich nach den Studien von Borovikova et al., die bei der Durchführung ihrer Versuche eine letale Dosis von 15 mg/kg KG wählte, wobei die Ratten aber nur bis zu einer Stunde nach Injektion überleben mussten (Borovikova et al. 2000b). Es zeigte sich während unserer Etablierungsphase, dass solch hohe LPS-Dosen bei narkotisierten Ratten zu ausgeprägten septischen Symptomen führten. Dabei kam es zuerst zu der erwarteten hyperdynamen Kreislauftsituation mit erhöhter Auswurfleistung und einer anschließenden hämodynamischen Destabilisierung, die jedoch sehr schnell in einem tödlichen Kreislaufversagen (nach 2 h bis 3 h) endete. In nicht narkotisierten Tieren

führen i.v.-Injektionen mit hohen LPS-Konzentrationen nicht zum Versterben (z. B. Liu et al. 2007). Ein mangelnder Muskeltonus bzw. fehlende Bewegung in tiefer Narkose tragen vermutlich zu einer Destabilisierung des Kreislaufs durch LPS induzierte Schocksymptome bei und führen zu einem verfrühten Tod der Ratten. Die zu injizierende LPS-Dosis sollte für die Versuche so beschaffen sein, dass eine moderate septische Reaktion mit Beeinträchtigung der Herzfunktion klar erkennbar war, jedoch nicht bzw. lediglich „spät“ zum Versterben (nach 4,5 h) führte. Dieses Ziel wurde erst nach einer schrittweisen Herabsetzung der LPS-Dosis mit einer niedrigen Injektion von 1 mg/kg i.v. erreicht (Tab. 4). In der Literatur werden darüber hinaus auch mittlere LPS-Mengen (um 5 mg/kg) als nicht letale Dosierungen in Verbindung mit einer längeren Anästhesie bei Ratten beschrieben (Mihaylova et al. 2012). Neben der bereits erwähnten Beanspruchung der Tiere durch die Narkose entsteht am Herz eine zusätzliche Belastung durch die Verwendung des Druck/Volumen-Katheters. Dies könnte ein weiterer Grund für die verminderte Überlebenszeit unter Narkose in Verbindung mit mittleren und höheren LPS-Konzentrationen sein. Kontrolltiere, die keinen LPS-Bolus erhielten, überlebten die geplante Versuchsdauer von 6 h ohne eine wesentliche Beeinflussung ihrer Hämodynamik (Tab. 2 und Abb. 22).

Millar-Katheter

Die Nachteile in der Anwendung des Druck/Volumen-Katheters (siehe auch Kapitel 3.3, 3.4.4 und 3.4.5) bestehen vor allem in den hohen Anschaffungskosten und seiner Fragilität, die ihn besonders anfällig für Beschädigungen und Defekte macht. Darüber hinaus kann es in seltenen Fällen bei der Einlage des Katheters zur Perforation des Gefäßes sowie zu Verletzungen der Aortenklappe und des Myokards kommen. Auch ist der Einsatz des Katheters ausschließlich im anästhesierten Tier möglich, was wiederum Einfluss auf die zu untersuchenden kardialen Funktionsparameter hat. Dessen ungeachtet wird die Verwendung dieser Kathetertechnik jedoch als Goldstandard bei hämodynamischen Untersuchungen im Kleintier angesehen (Georgakopoulos et al. 1998).

Narkose

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Aspekt ist die Wahl der Narkoseform. Für die geplanten Versuche musste die Anästhesie so durchgeführt werden, dass sie eine lange Versuchsdauer ermöglichte, eine langanhaltende chirurgische Toleranz bot und keine

relevanten kardiodepressiven Eigenschaften besaß. Heute werden größtenteils Injektionsnarkosen mit langwirksamen Narkotika (z. B. Ketamin, Xylazin) verwendet, bei denen aber keine exakte Narkosesteuerung möglich ist. Dies sollte aber gerade bei einer Anästhesie über längeren Zeitraum gewährleistet sein. Narkosen mit dem relativ kurzwirksamen Propofol sind ebenfalls in Langzeitversuchen einsetzbar. Sie haben jedoch eine deutliche Reduzierung des Herzzeitvolumen zur Folge (Larsen 2012). Daher wurde in den durchgeführten Experimenten eine Isofluran-Inhalationsnarkose mit maschineller Beatmung an endotracheal intubierten Ratten angewandt. Als positiv ist dabei vor allem die einfache Anwendung zu vermerken. Isofluran induziert eine für die Tiere stressfreie und schnelle Anästhesie, die ohne Probleme im Laufe des Versuches an verschiedene Bedingungen angepasst werden kann. Allerdings wird diesem Inhalationsanästhetikum ebenfalls ein negativ inotroper Effekt auf das Myokard zugesprochen, der jedoch als relativ schwach eingestuft wird (Eger 1981; Vivien et al. 1997). Auf das Herzzeitvolumen hat das Isofluran keinen oder nur geringen Einfluss, es bleibt unabhängig von der Gaskonzentration stabil (Stevens et al. 1971; Larsen 2012). Unter Anwendung dieses Narkosemittels kommt es desweiteren oft zu einem Blutdruckabfall, da der periphere Gefäßwiderstand vermindert wird (Eger 1981). Dies konnte auch bei unseren Versuchen in den Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 25). Ebenso wird dem Isofluran eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen (Boost et al. 2009; Flondor et al. 2008). Von Picq et al. wurde kürzlich der Einfluss von Isofluran auf die Immunantwort in Ratten mit Vagusnervstimulation getestet. Dabei konnte ebenfalls eine reduzierte proinflammatorische Reaktion im Vergleich mit einem anderen Injektionsanästhetikum (Pentobarbital) beobachtet werden (Picq et al. 2013). Dieser antiinflammatorische Effekt ist für die von uns durchgeführten Versuche durchaus kritisch zu betrachten und wird durch den Vergleich der Versuchsgruppen, die eine identische Narkose bekamen, einbezogen. Da das Isofluran keinerlei analgetische Wirkung besitzt, musste während der Versuche zusätzlich noch ein Schmerzmittel verabreicht werden, um eine absolute Schmerzausschaltung zu gewährleisten. Dabei wurde auf Fentanyl, ein hochpotentes Opioid, zurückgegriffen, welches aufgrund seiner kurzen Wirksamkeit als stetige Infusion i.v. verabreicht wurde. Auch dieses besitzt antiinflammatorische Eigenschaften (Bencsics et al. 1997), verfügt jedoch bei der Ratte über keine kardiovaskulären Nebenwirkungen (Baechtold et al. 2001). Zusätzlich wurde während der Narkose darauf geachtet, dass es nicht zu einem Auskühlen der Ratten kam. Dies ist besonders bei kleinen Versuchstieren lebens-bedrohlich (Ausschuss für

Anästhesiologie - GV SOLAS 2001). Dafür wurde mit einer Rektalsonde die Körpertemperatur durchgehend gemessen und mit Hilfe einer regulierbaren Wärmematte und Rotlichtlampe bei ca. 37 °C gehalten.

Die unbehandelten Kontrolltiere überlebten die gesamte Versuchsdauer, wobei der Blutdruck durch den oben beschriebenen Effekt des Isoflurans langsam absank, die kardialen Funktionsparameter hingegen kaum beeinträchtigt wurden (Tab. 2). So konnte durch die Kontrollversuche nachgewiesen werden, dass eine mehrstündige, stabile Narkose unter den vorgegebenen Bedingungen möglich ist.

Fazit

Insgesamt kann die Charakterisierung des Endotoxin-Tiermodells und seine Etablierung für unsere Versuchszwecke als erfolgreich angesehen werden. Insbesondere die Erweiterung des linken Ventrikels (Zunahme des Volumens und Absinken des Drucks), die damit verbundene reduzierte Auswurfleistung und der Verlust der Kompensationsmöglichkeit über eine Erhöhung der Herzfrequenz entsprechen dem klinischen Bild einer septischen Kardiomyopathie. Die vorhandenen bzw. entstandenen „Nebenwirkungen“ (z. B. die antiinflammatorische Eigenschaft des Isoflurans und Fentanyls) mussten dabei in Kauf genommen und im Zusammenhang mit den Ergebnissen beurteilt werden.

5.2 Der Einfluss des *Nervus vagus* auf die Hämodynamik und die Immunreaktion

Das autonome Nervensystem (ANS) besteht aus einem sympathischen und parasympathischen Anteil. Der *N. vagus* ist der größte Hirnnerv und vermittelt maßgeblich über die Innervation verschiedener innerer Organe (z. B. Herz, Lunge, Teile des Verdauungstraktes u. a.) vom Halsbereich abwärts bis hin in das Abdomen die Funktion des parasympathischen Nervensystems. Der rechte und linke Vagusnerv verlassen über die *Medulla oblongata* das Gehirn durch das *Foramen jugulare*, durchlaufen das *Ganglion nodosum*, ziehen, zervikal zum Ösophagus, entlang durch den Thorax und treten durch das Zwerchfell ins Abdomen ein (Bonaz et al. 2013). Ein wichtiger Aspekt im Krankheitsgeschehen der Sepsis und dem septischen Schock ist die autonome

Dysfunktion (Ebelt und Werdan 2010), die u. a. zu einer reduzierten Herzfrequenzvariabilität mit fixierter relativer Tachykardie führt (Schmidt et al. 2005b). Eine cholinerge Stimulation könnte daher möglicherweise die fehlende parasympathische Innervation wiederherstellen und zu einer Besserung der Hämodynamik im septischen Geschehen beitragen.

5.2.1 Der Verlust des vagalen Tonus führt zu einer massiven Störung der Hämodynamik und gesteigerten Zytokinspiegel im septischen Schock

In den durchgeführten Versuchen wurde der rechte Vagusnerv in Höhe des Halsbereiches durchtrennt (zervikale Vagotomie). Dieser Eingriff führte bei den endotoxämischen Ratten zu einer starken Beeinträchtigung der kardialen Funktionsparameter (Abb. 29 bis Abb. 31) mit einer damit verbundenen verkürzten Lebensdauer (Vergleich Abb. 22 mit Abb. 23 und Tab. 3) und stellte somit einen klaren Überlebensnachteil dar. Es ist anzunehmen, dass eine Vagotomie durchaus zu bedingten Veränderungen in den parasympathisch innervierten Organen im gesamten Organismus führt. So nimmt eine Vagotomie z. B. Einfluss auf die Herzfrequenz und den Baroreflex (Lund et al. 1992). Um diese Veränderungen so gering wie möglich zu halten, erfolgte in den Versuchen nur eine einseitige Transsektion des rechten Vagusnervs. Bei Versuchstieren mit intaktem Vagusnerv, die lediglich LPS erhielten, kam es ca. eine Stunde nach der Injektion zu einer erwarteten hyperdynamen Hämodynamik. Dabei wurde die Verminderung des peripheren Gefäßwiderstands durch eine gesteigerte Herzfrequenz und erhöhtem *Cardiac Output* sowie einer damit verbundenen vergrößerten Ejektionsfraktion ausgeglichen (Abb. 24, Abb. 26 und Abb. 27), der Blutdruck fiel währenddessen ab (Abb. 25). In dieser Phase verblieben diese Tiere etwa zwei Stunden. Im weiteren Verlauf des Versuchs kam es zum Verlust der Kompensationsfähigkeit und einer abnehmenden, verminderten Herzfunktion (hypodyname Phase). Dieser Kompensationseffekt war bei den Ratten mit Vagotomie nur andeutungsweise vorhanden. Das Versagen des kardiovaskulären Systems hatte ein frühes Versterben zur Folge. Ob eine Vagotomie auch in gesunden bzw. nicht endotoxämischen Ratten eine Auswirkung auf das Überleben besitzt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine Vagotomie

allein keinen negativen Einfluss auf den Zustand gesunder Tiere hat (Kessler et al. 2012; Mihaylova et al. 2012). Darüber hinaus konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine subdiaphragmatische Vagotomie die durch Stress bzw. intraperitoneale Injektion von IL-1 β ausgelöste Hyperthermie verhindert, da das Entzündungssignal über die afferenten Vagusfasern nicht mehr zum Gehirn weitergeleitet werden kann (Watkins et al. 1995).

Durch die Verabreichung von LPS kommt es zu der in der Einleitung beschriebenen (Kapitel 1.2.2) Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den TLR4. Das Ergebnis dieser Aktivierung ist die Synthese und übermäßige Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, die für die Schädigung der Gefäße und dem damit verbundenen massiv reduzierten Gefäßwiderstand verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit konnte im Plasma und dem ventrikulären Gewebe der mit LPS-behandelten Ratten geringfügig bis mäßig erhöhte Spiegel von TNF- α und IL-1 β (Abb. 32 bis Abb. 34) gemessen werden. Diese Zytokine sind für die kardiale Depression in der Sepsis mitverantwortlich (Kumar et al. 1996; Cain et al. 1999; Maass et al. 2002). Anhand isolierter Kardiomyozyten aus der Ratte konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 β den transienten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum steigern und somit für den Verlust der Zellkontraktilität verantwortlich sind (Duncan et al. 2010).

Alle in dieser Arbeit gemessenen Zytokinlevel stellen jedoch nur Zeitpunktbeobachtungen dar. Demzufolge wären stark erhöhte TNF- α -Spiegel, wie sie bei Borovikova et al. eine Stunde nach LPS-Gabe in den Ratten zu finden sind (Borovikova et al. 2000b), zu einem ebenso frühen Messzeitpunkt durchaus denkbar gewesen. Aufgrund des geringen Blutvolumens der Ratten wurde in dieser Arbeit auf eine regelmäßige Entnahme von Blutproben verzichtet. In der frühen Phase des Krankheitsverlaufs ist die Expression der proinflammatorischen Mediatoren gesteigert. Im Gegensatz dazu können in einer späteren Phase die Konzentrationen dieser Mediatoren nur noch in geringen Mengen vorliegen oder bereits unter die Nachweisgrenze gefallen sein. In einem Sepsismodell an Primaten konnte vier bis sechs Stunden nach Sepsisinduktion kein TNF mehr nachgewiesen werden (Tracey et al. 1987). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen liegt die Genexpression von TNF- α in den Ventrikeln der Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt bereits auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen (Abb. 35). Die Genexpression von TNF- α nach Vagotomie ist im Gegensatz dazu stark hochreguliert.

Dies zeigte sich im Herzgewebe, aber auch im Plasma der Ratten durch deutlich erhöhte TNF-Level. Eine tendenziell stärkere Expression von TNF- α auf Protein- und RNA-Ebene war im rechten Ventrikel zu verzeichnen. Bereits in einer früheren Studie konnte diese Beobachtung an endotoxämischen Rattenherzen festgestellt werden (Markel et al. 2007). Neben der TNF- α -Expression wurde dort zusätzlich auch die Funktion der beiden Ventrikel untersucht. Es zeigte sich wider Erwarten, dass trotz des höheren TNF- α -Spiegels im rechten Ventrikel dessen Funktion, im Vergleich zum linken Ventrikel, weniger beeinträchtigt war. Die Autoren sprachen daher von einer rechtsventrikulären TNF-Toleranz, die eventuell durch die Abstammung der rechten und linken Kardiomyozyten aus verschiedenen Progenitorzellen zu erklären ist (Markel et al. 2007). Denkbar wären daher andersartige intrazelluläre Signalwege in den rechten Kardiomyozyten, die zu einer besseren Aufrechterhaltung der Zellfunktion trotz Anwesenheit von Endotoxin und proinflammatorischen Zytokinen beitragen (Markel et al. 2007).

Neben den nach Vagotomie gesteigerten TNF- α -Spiegeln wurden auch hohe Werte an IL-1 β im Plasma und rechten Ventrikel gemessen. Lediglich im linken Ventrikel war die Expression vermindert. Dies könnte jedoch an der kleineren Gruppengröße liegen, die in diesem Fall aus nur drei Versuchstieren bestand. Die dargestellten Ergebnisse bezüglich einer gesteigerten Inflammation im Plasma und kardialen Gewebe bei Vagotomie stimmen mit den bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen überein (Borovikova et al. 2000b). Für eine negative Regulation der TNF-Synthese sind u. a. Corticosteroide verantwortlich, die über die hypothalam-hypophysär-adrenale Achse sezerniert werden. Im Falle der Vagotomie ist die Signalweiterleitung zum Gehirn hin nicht möglich und die Aktivierung daher vermindert. Dies wiederum trägt anscheinend zu den erhöhten proinflammatorischen Zytokinspiegeln bei (Borovikova et al. 2000b). Somit besitzt offensichtlich auch der afferente Anteil des *N. vagus* antiinflammatorische Eigenschaften (Bonaz et al. 2013). Das verstärkte Vorhandensein von TNF- α und IL-1 β ist aufgrund ihres kardiodepressiven Charakters für das sehr schlechte hämodynamische *Outcome* in der Vagotomie-Gruppe mitverantwortlich. Demzufolge wird die protektive und immunmodulatorische Eigenschaft des *N. vagus* (Czura und Tracey 2005) im Falle eines immunologischen Ungleichgewichts dringend benötigt, um die Balance, auch in Bezug auf die in der Sepsis gestörte Herzfunktion, aufrechtzuerhalten oder vielmehr wiederherzustellen bzw. sie zumindest zu verbessern.

5.2.2 Eine elektrische cholinerge Stimulation kann die Beeinträchtigung der Hämodynamik durch den Vagotomie-Effekt nur teilweise kompensieren

Bereits zur jetzigen Zeit findet eine therapeutische, meist elektrische Vagusstimulation, Anwendung bei Patienten mit Depressionen oder Epilepsie (Beekwilder und Beems 2010). Ziel dieser Stimulationen sind dabei die afferenten Fasern des Nervi, die hochfrequent (20 - 30 Hz) stimuliert zu einem verbesserten Befinden innerhalb des Symptomkomplexes dieser Erkrankungen führen und mit wenigen Nebenwirkungen verbunden sind. In Bezug auf die immunmodulatorischen Eigenschaften des *N. vagus* haben aber vor allem seine efferenten Fasern eine große Bedeutung. Eine Stimulation, die die Aktivierung des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ bewirkt, kann hierbei sowohl elektrisch mit einer niedrigen Frequenz (1 - 10 Hz) als auch pharmakologisch durch z. B. Cholinesteraseinhibitoren erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Verabreichung von Physostigmin (Anticholinium®), einem in der klinischen Routine eingesetzten Cholinesterasehemmer, versucht, die hämodynamische Beeinträchtigung im endotoxämischen Schock durch die Steigerung der endogenen AcetylcholinKonzentration zu verbessern. In einem CLP-induzierten septischen Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die medikamentöse Inhibition der Cholinesterase mit Physostigmin einen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse hat (Hofer et al. 2008). In unseren Versuchen jedoch führte die Verabreichung des Cholinesteraseinhibitors zu einer Verkürzung der Überlebenszeit der endotoxämischen Ratten. Dass das Physostigmin keinen protektiven Effekt aufweist, könnte vor allem an dem doch sehr unterschiedlich gestalteten Versuchsdesign liegen. Mäuse, die an der durch eine CLP ausgelösten Sepsis erkrankten, erhielten in dieser Studie über drei Tage eine dreimalige Physostigmin-Dosis (80 µg/kg KG) intraperitoneal (i.p.). Dagegen erhielten die vagotomierten Ratten in unserem Modell einen einmaligen i.v.-Bolus (80 µg/kg KG) mit einer sich anschließenden weiteren geringen Infusion des Inhibitors (12,5 µg/kg/h KG). Durch die i.v.-Applikation konnte das Physostigmin seine Wirkung direkt und schnell „entfalten“, so dass kurz nach Verabreichung des Medikamentes ein Abflachen der Narkose mit steigender Herzfrequenz beobachtet werden konnte. Das Physostigminmetabolit Eserolin bewirkt über eine zentrale Beeinflussung der peripheren Adrenalinfreisetzung aus der Nebenniere eine Herz- und Kreislaufstimulierende Wirkung (Köhler Chemie GmbH 2011). Da die Ratten sich nicht mehr in

einem ausreichend tiefen Narkosestadium befanden, könnte eine gesteigerte Stressreaktion in Verbindung mit dem septischem Schock Grund für ein verfrühtes Versterben der Tiere gewesen sein. Demzufolge hätte die Dosis geringer gewählt werden müssen, um den protektiven Effekt des Medikamentes ausnutzen können und eine „Überdosierung“ zu vermeiden. Somit wurden die Versuche mit dem eigentlich vielversprechenden Cholinesterasehemmer Physostigmin eingestellt. Für zukünftige Experimente müssen zusätzliche Überlegungen hinsichtlich der Dosierung und dem Erstellen von Kontrollgruppen getätigt werden.

Neben einer pharmakologischen Stimulation wurden in dieser Arbeit auch Experimente mit einer elektrischen Stimulation des Vagusnervs durchgeführt. Diese Methode wird bereits seit einigen Jahren erfolgreich in septischen Tiermodellen für eine Modulation der inflammatorischen Reaktion eingesetzt und spielt mittlerweile unter dem Begriff des „cholinergen antiinflammatorischen Reflexes“ innerhalb der Erforschung antiinflammatorisch wirkender Mechanismen eine beachtliche Rolle. Die Einstellungen für die Stimulation des rechten Vagus wurden so gewählt, dass keine Beeinflussung der Herzfrequenz stattfand. Durch die Stimulation der vagotomierten, endotoxämischen Ratten konnte die Überlebenszeit gegenüber den unstimulierten Ratten mit Vagotomie (Abb. 23) deutlich gesteigert werden. Die Tiere verstarben jedoch zeitlich früher als die LPS-Ratten mit intaktem Nerv. Auch die Hämodynamik wurde durch die Stimulation positiv beeinflusst. Ein Kompensationseffekt, wie er bei den Ratten ohne Vagotomie aufgetreten ist, konnte aber nicht beobachtet werden. Dennoch blieben der *Cardiac Output* und die Ejektionsfraktion (Abb. 30 und Abb. 31) über drei Stunden verhältnismäßig konstant und fielen erst danach erheblich ab. Die einmalige Stimulation bewirkte daher lediglich ein verzögertes Auftreten des durch die Vagotomie hervorgerufenen negativen Effekts. Möglicherweise hätte eine kontinuierliche Stimulation den fehlenden Tonus ersetzen und zu einer effektiveren Verbesserung der Herzfunktion im septischen Schock führen können. Dementsprechend verhielt es sich auch mit der Zytokinexpression von TNF- α im Plasma und den Ventrikeln. Die Spiegel lagen deutlich unterhalb denen der unstimulierten Tiere, was auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen antiinflammatorischen Effekt der Vagusstimulation überein (Borovikova et al. 2000b). Bernik et al. zeigte überdies in einer Studie, dass die Stimulation des intakten Nervs einen protektiven Effekt hat und die Entwicklung eines endotoxämischen Schocks in

anästhesierten Ratten mit LPS-Injektion verhindert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen rechts- und linksseitiger Vagusstimulation festgestellt werden (Bernik et al. 2002). Die Expression von IL-1 β zeigte in unseren Versuchen im Plasma ein dem TNF- α ähnliches Muster (Abb. 32), wonach die Produktion des Zytokins bei Stimulation erniedrigt ist. In den Ventrikeln stimulierter Ratten war diese jedoch deutlich erhöht und lag sogar über denen der Versuchstiere, die nur vagotomiert waren. Durch die elektrische Stimulation wird also die proinflammatorische Zytokinexpression zumeist gesenkt und die kürzere Stimulationsdauer zeigt dabei eine tendenziell, aber nicht signifikant bessere Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Expression antiinflammatorisch wirkender Zytokine (z. B. IL-10) durch eine Vagusstimulation nicht beeinflusst wird (Borovikova et al. 2000b). Antiinflammatorische Zytokine werden im Rahmen einer normalen Immunantwort synthetisiert und hemmen die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Czura und Tracey 2005). Desweiteren existieren auch humorale Mechanismen (z. B. mit Glucocorticoiden), die zu einer antiinflammatorischen Reaktion beitragen. Diese wirken jedoch im Gegensatz zum inflammatorischen Reflex nur langsam und in Abhängigkeit eines Konzentrationsgradienten (Tracey 2002).

Neben den bereits hier erwähnten Methoden der Vagusstimulation existieren weitere Möglichkeiten, den „cholinergen Reflex“ zu aktivieren. Eine Aktivierung kann auch durch eine pharmakologische Stimulation der peripheren muskarinergen Rezeptoren oder der $\alpha 7$ Untereinheit des nikotinergen Acetylcholinrezeptors ($\alpha 7$ AChR) erfolgen. CNI-1493 wirkt über eine Interaktion mit muskarinergen Rezeptoren und verhindert die proinflammatorische Zytokinfreisetzung von Monozyten und Makrophagen (Borovikova et al. 2000a; Pavlov et al. 2006). Nikotin ist ein relativ unspezifischer $\alpha 7$ AChR-Agonist, der die Produktion proinflammatorischer Zytokine in humanen Makrophagen inhibiert (Czura und Tracey 2005; Wang et al. 2004). GTS-21 ist ebenfalls ein $\alpha 7$ AChR-Agonist, der eine immundämpfende Wirkung besitzt und die Überlebenschancen in septischen Mäusen verbessert (Pavlov et al. 2007).

Somit ergeben sich, den „cholinergen Reflex“ betreffend, zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapieformen im inflammatorischen Geschehen verschiedener Krankheiten.

5.3 Das Herz als mögliches Bindeglied zwischen Immun- und Nervensystem - Hypothese zum cholinergen anti-inflammatorischen Reflex

Es wurde postuliert, dass die Milz eine zentrale Stellung innerhalb des „cholinergen Reflexes“ einnimmt (Huston et al. 2006). Ausgehend von einer derzeitig stattfindenden Diskussion um eine parasympathische Innervation der Milz und der Annahme, dass ihre Beteiligung am „cholinergen antiinflammatorischen Reflex“ nicht vorhanden ist (Matteoli et al. 2014), stellt sich weiter die Frage nach der Verbindungsstelle zwischen Immun- und Nervensystem. In Anlehnung an die frühen Experimente von Otto Loewie, mit denen er zeigte, dass das Herz nach Stimulation des Vagusnervs Acetylcholin freisetzt (siehe auch Kapitel 1.3.1), könnte dieses Organ die zentrale Stellung in dieser Fragestellung einnehmen. Im Gegensatz zur Milz weist das Herz eine direkte parasympathische Innervierung durch den *N. vagus* auf. Das Ausmaß dieser Innervation in den Atrien und Ventrikeln ist zwar gering, aber grundsätzlich vorhanden (Vaseghi und Shivkumar 2008). Im Gegensatz dazu sind der Atrioventrikularknoten, der die Erregungsleitung vom Vorhof zur Kammer steuert und die Kontraktion des Herzmuskels beeinflusst, durch den linken Vagusnerv und der Sinuatrial-Knoten, der die Herzfrequenz reguliert, durch den rechten Vagusnerv stark innerviert. Dies könnte die Quelle des kardial freigesetzten Acetylcholins sein, das so seine immunmodulatorische Funktion auf die Kardiomyozyten und in den Blutkreislauf gelangend, auf andere Immunzellen ausübt. Daneben können die Kardiomyozyten auch selbst Produktionsort nicht-neuronalen Acetylcholins sein (Kakinuma et al. 2009). In murinen Herzzellen war es möglich, alle Acetylcholin-produzierenden Enzyme nachzuweisen (Kakinuma et al. 2009; Rana et al. 2010; Rocha-Resende et al. 2012). Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der die Autoren postulierten, dass das von den Kardiomyozyten freigesetzte Acetylcholin für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Herzen benötigt wird (Roy et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte eine mRNA-Expression der Cholinacetyltransferase in den Ventrikeln nicht festgestellt werden. Lediglich eine Expression der Carnitinacetyltransferase (Abb. 36) wurde im linken und rechten Ventrikel gefunden. In Übereinstimmung damit kann jedoch eine Studie von Slavikova und Tucek angesehen werden. Dort zeigten die Autoren, dass die Cholinacetyltransferase hauptsächlich in den Atrien exprimiert wird, wohingegen das meiste Acetylcholin in den Ventrikeln mit Hilfe der Carnitinacetyltransferase synthetisiert wird (Slavikova

und Tucek 1982). Die höchste Aktivität der Cholinacetyltransferase nach Vagotomie konnte im rechten Atrium (RA), die niedrigste im linken Ventrikel (LV) gemessen werden (ChAT-Aktivität: RA > LA > RV > LV; Lund et al. 1979). Die Expression der Carnitinacetyltransferase im linken Ventrikel zeigte keine signifikante Veränderung, im Gegensatz dazu war sie im rechten Ventrikel deutlich höher und in den Gruppen mit Vagotomie signifikant herunterreguliert (Abb. 36). Die fehlende parasympathische Innervation hatte somit einen negativen Einfluss auf die Expression des Acetylcholin-produzierenden Enzyms im rechten Ventrikel. Neben Acetylcholin-produzierenden Enzymen exprimiert das Herz auch eine Vielzahl verschiedener Subeinheiten der Acetylcholinrezeptoren (Dvorakova et al. 2005), darunter auch die $\alpha 7$ Untereinheit, welche für eine Inhibition der proinflammatorischen Zytokinbildung verantwortlich ist. Nicht auszuschließen ist daher, dass Herzmuskelzellen sowohl Produktions-, als auch Bestimmungsort des Acetylcholins sind und seine Synthese durch eine para- bzw. autokrine Art und Weise gefördert wird. Dass der cholinerge Reflex eine spezifische Wirkung auf das Herz hat, konnte durch die erniedrigten Zytokinlevel im kardialen Gewebe nach Stimulation nachgewiesen werden (Bernik et al. 2002).

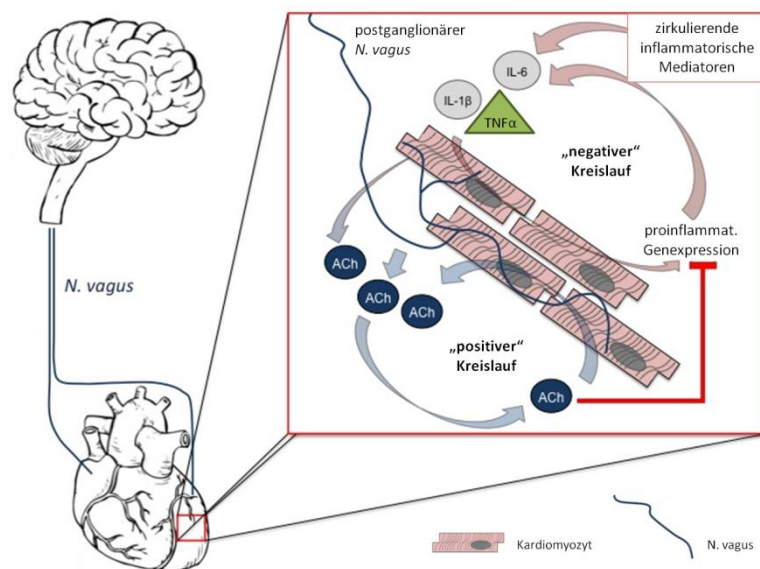


Abb. 37: Hypothese zum cholinergen inflammatorischen Reflex am Herzen. Durch zirkulierende inflammatorische Mediatoren (wie z. B. IL-1 β , IL-6, TNF- α) wird ein hoch kardiodepressives Milieu erzeugt, das durch eine von den Kardiomyozyten selbst gesteigerte Genexpression proinflammatorischer Mediatoren weiter verstärkt wird („negativer“ Kreislauf). Das nach Stimulation von den terminalen Enden des *N. vagus* freigesetzte bzw. von den Kardiomyozyten selbst produzierte Acetylcholin (ACh) dämpft die proinflammatorische Immunantwort („positiver“ Kreislauf) der Herzmuskelzellen ab, das depressive Milieu wird aufgehoben und die Herzfunktion verbessert sich (nach Florian Uhle).

Um die Hypothese zum cholinergen inflammatorischen Reflex mit einer Beteiligung des Herzens zu bestätigen (Abb. 37), müssen aber zusätzliche Studien, auch in Bezug auf die Sekretion des Acetylcholins aus dem Herzgewebe, getätigt werden.

5.4 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den schon in früheren Studien beobachteten positiven Effekt einer Vagusstimulation, diesmal jedoch nicht nur im Hinblick auf die antiinflammatorischen Qualitäten, sondern auch auf die hämodynamische Beeinflussung. So kann ein positiver Einfluss auf die kardiale Inflammation und Herzfunktion unter endotoxämischen Bedingungen durch die Stimulation des *N. vagus* beschrieben werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Carnitin-acetyltransferase, welche auch für die Synthese von Acetylcholin verantwortlich sein kann, im ventrikulären Herzgewebe exprimiert wird und einer ventrikelspezifischen Regulation unter experimentellen Bedingungen unterliegt. In Anbetracht dieser Resultate könnte das Herz eine hervortretende Rolle als Bindeglied zwischen Immun- und Nervensystem einnehmen.

Der „cholinerge antiinflammatorische Reflex“ scheint einen therapeutisch einsetzbaren Ansatz zu bieten. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit wäre es daher sinnvoll, Experimente bei Tieren mit intaktem *N. vagus* durchzuführen, um auch Stimulations-effekte in Bezug auf die afferente Signalweiterleitung zu überprüfen. So kann die Differenz zwischen Tiermodell und dem realen klinischen Geschehen ein Stück weit verringert werden.

6 Zusammenfassung

Die Sepsis und der septische Schock stellen trotz intensiver Forschung und neuer Therapiemöglichkeiten die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen der westlichen Welt dar. Während des septischen Krankheitsverlaufs kommt es meist zu einer kardialen Depression mit charakteristisch beeinträchtigter Hämodynamik. Neben der ausgelösten Entzündungsreaktion ist der Verlust der parasympathischen Innervation ein wichtiger Aspekt im Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie. Das Acetylcholin ist der hauptsächliche Transmitter des efferenten Teils des parasympathischen *N. vagus* und spielt eine zentrale Rolle im Organismus sowie auch bei der Signalübertragung innerhalb des Immunsystems. In der Annahme, dass ein potentieller Zusammenhang zwischen der Störung im vagalen System und der beeinträchtigten Hämodynamik während der Sepsis besteht, sollte in dieser Arbeit der Einfluss einer Vagusstimulation auf die myokardiale Entzündung und die Herzfunktion in einem LPS-induzierten septischen Schockmodell in Ratten beurteilt werden. Trotz der geringen Innervation des Herzwesens durch den Vagusnerv könnte darüber vermittelt im Herzen ein antiinflammatorischer Effekt wirken, der die proinflammatorische Genexpression in den Kardiomyozyten inhibiert und zu einer Verbesserung der Herzfunktion beiträgt.

In den durchgeführten Versuchen wurde der distale Teil des rechten zervikalen *N. vagus* in vagotomierten, endotoxämischen Lewis-Ratten stimuliert. Die hämodynamischen Parameter wurden mittels eines linksventrikulär in die Ratten eingebrachten Druck/Volumen-Katheters gemessen und aufgezeichnet. Im Anschluss an die Experimente wurden Herz und Blutplasma entnommen und die Expression proinflammatorischer Zytokine mittels quantitativer RT-PCR und ELISA bestimmt.

Die Entzündungsreaktion war durch die Vagotomie deutlich gesteigert. Dies konnte durch den Nachweis erhöhter Zytokinspiegel im Plasma und Herzwesens gezeigt werden. In Übereinstimmung damit zeigten diese Tiere während des septischen Schocks eine beeinträchtigte Herzfunktion. Um den hämodynamischen und immunologischen Effekt des verminderten vagalen Tonus zu kompensieren, genügte eine kurze Stimulation während der LPS-Infusion. Der *N. vagus* spielt somit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Hämodynamik und der kardialen Immunhomöostase im septischen Geschehen.

7 Summary

Sepsis and septic shock are, despite intensive research and new therapeutic options, the major cause of death on non-cardiac intensive care units in western civilization. During the course of sepsis myocardial depression develops with significant hemodynamic impairment. Beside the triggered inflammatory processes, one important aspect of this septic cardiomyopathy is the failure of parasympathetic innervation, leading to autonomic dysfunction. Acetylcholine, the main transmitter of the efferent parasympathetic *Nervus vagus*, has been shown to be of importance for transmission of signals within the immune system, but also for a variety of other functions throughout the organism. Hypothesizing a potential correlation between the dysfunction of the vagal system and hemodynamic impairment during sepsis, we wanted to assess the impact of vagal stimulation on myocardial inflammation and function in a murine model of lipopolysaccharide (LPS)-induced septic shock. Since the myocardial tissue receives (sparsely) innervation by the *vagal nerve*, there might be an anti-inflammatory effect in the heart, inhibiting pro-inflammatory gene expression in cardiomyocytes and improving cardiac function.

In this study electrical stimulation on the distal part of the right cervical branch of the *N. vagus* in vagotomized, endotoxemic Lewis rats were performed. Hemodynamic parameters were measured during the recording periods using a left ventricular pressure-volume catheter. After the experiments, hearts and blood plasma were collected and expression of pro-inflammatory cytokines was measured using quantitative RT-PCR and ELISA.

Following vagotomy, the inflammatory response was aggravated, represented by elevated plasma cytokine levels in plasma and ventricular tissue. In concordance, impairment of cardiac function during septic shock was pronounced in these animals. To reverse both, hemodynamic and immunological effects of diminished vagal tone, even a brief stimulation of the *N. vagus* was enough during initial LPS infusion. Overall, the *N. vagus* might play a major role in maintaining hemodynamic stability and cardiac immune homeostasis during septic shock.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CarAT	Carnitinacetyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
CO	<i>cardiac output</i> (Herzzeitvolumen, [ml/min])
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion [%]
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
F	French

g	Gramm
G	Gauge
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure
HF	Herzfrequenz [1/min]
HRV	<i>heart rate variability</i> (Herzfrequenzvariabilität)
Hz	Hertz (Frequenz)
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
k	kilo- (10^3)
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli- (10^{-3})
M	Molar [mol/l]
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOV	Multiorganversagen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde (Dauer)
μ	mikro- (10^{-6})
n	nano- (10^{-9})
nAChR	nikotinerge Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid

PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RVU	relative Volumeneinheiten
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht ($\lambda \leq 340$ nm)
V	Volt (Spannung)
VAcHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
VGX	Vagotomie
VNS	Vagusnervstimulation
vs.	<i>versus</i>
VT	Volumenteil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Infektion, SIRS und Sepsis.....	2
Abb. 2:	Graphische Darstellung der Sepsis-Neuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2003.	3
Abb. 3:	Der Signalweg von TLR4 ausgelöst durch seinen Liganden LPS.	5
Abb. 4:	Die Immunantwort während der Sepsis.	7
Abb. 5:	Die Kardiodepression bei der schweren Sepsis und im septischen Schock.	9
Abb. 6:	Übersicht der pathophysiologische Mechanismen bei der septischen Kardiomyopathie.	10
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Froschherzexperiments von Otto Loewi.	12
Abb. 8:	Synthese, Abgabe und Abbau von Acetylcholin in nicht-neuronalen Zellen.	13
Abb. 9:	Die Signalweiterleitung beim inflammatorischen Reflex.	15
Abb. 10:	Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsabläufe.....	25
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Lage des Druck/Volumen-Katheters im linken Ventrikel.	27
Abb. 12:	Linksventrikuläre Druck/Volumen-Kurven einer Lewis-Ratte unter Normalbedingungen.	28
Abb. 13:	Einleitung der Narkose und Intubation der Ratte.	30
Abb. 14:	Katheterisierung der Schwanzarterie bei der Ratte.	32
Abb. 15:	Gesamtübersicht der aufgezeichneten Parameter mit LabChart.	33
Abb. 16:	Darstellung der <i>Arteria carotis communis dextra</i> und des <i>Nervus vagus</i>	34
Abb. 17:	Druckkurve in der Aorta und im linken Ventrikel.	34
Abb. 18:	Veränderung des Konduktanz-Signals im linken Ventrikel während der Injektion hypertoner NaCl-Lösung.	35
Abb. 19:	Graphische Darstellung der Parallel-Konduktanz Berechnung mit PVAN.	36
Abb. 20:	Anbringen der Stimulationselektrode an den <i>Nervus vagus</i>	37
Abb. 21:	Das Prinzip der TaqMan [®] -Sonden PCR.....	41
Abb. 22:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Kontrolltiere und der mit LPS-behandelten Ratten.	48
Abb. 23:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der endotoxämischen, vagotomierten sowie der kurz- und langfristig vagal stimulierten Ratten.	49

Abb. 24:	Die Herzfrequenz der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren.	52
Abb. 25:	Der arterielle Blutdruck der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren.....	52
Abb. 26:	Cardiac Output der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren.	53
Abb. 27:	Die Ejektionsfraktion der LPS-behandelten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren.....	54
Abb. 28:	Die Herzfrequenz von kurz- und langfristig stimulierten Ratten im Vergleich mit den unstimulierten Kontrolltieren.	56
Abb. 29:	Der arterielle Blutdruck von Kurz- und Langzeit stimulierten Ratten im Vergleich mit den nur vagotomierten Kontrolltieren.	57
Abb. 30:	Cardiac Output der stimulierten Ratten im Vergleich mit den nur vagotomierten Kontrolltieren.	58
Abb. 31:	Die Ejektionsfraktion der stimulierten Ratten im Vergleich mit den ausschließlich vagotomierten Kontrolltieren.....	59
Abb. 32:	Die Proteinkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Plasma der Ratten.....	60
Abb. 33:	Der Proteinanteil des proinflammatorischen Zytokins TNF- α im ventrikulären Gewebe der Ratten.	62
Abb. 34:	Der Proteinanteil des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β im kardialen Gewebe der Ratten.	63
Abb. 35:	Die mRNA-Expression von TNF- α im linken und rechten Ventrikel der Ratten.....	64
Abb. 36:	Die mRNA-Expression von CarAT im linken und rechten Ventrikel der Ratten.....	66
Abb. 37:	Hypothese zum cholinergen inflammatorischen Reflex am Herzen.	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Einteilung der verschiedenen Versuchsgruppen	24
Tab. 2:	Hämodynamik- und Temperaturmessungen der Kontrolltiere unter Isoflurannarkose über einen Versuchszeitraum von 6 h	47
Tab. 3:	Vergleich der Überlebenszeiten von nicht vagotomierten und vagotomierten LPS-behandelten Ratten	50
Tab. 4:	Animals-at-risk. (Kontrolle, LPS)	51
Tab. 5:	Animals-at-risk. (VGX-Ratten)	55

Literaturverzeichnis

Abraham, Edward (2003): Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. In: *J Infect Dis* 187, S. S364-9.

Abraham, Edward; Singer, Mervyn (2007): Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. In: *Critical Care Medicine* 35 (10), S. 2408–2416.

Agostoni, E.; Chinnock, J. E.; De Daly, M B; Murray, J. G. (1957): Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. In: *J Physiol* 135 (1), S. 182–205.

Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nat Rev Immunol* 4 (7), S. 499–511.

Aksoy, Ezra; Taboubi, Salma; Torres, David; Delbauve, Sandrine; Hachani, Abderrahman; Whitehead, Maria A. et al. (2012): The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. In: *Nat Immunol* 13 (11), S. 1045–1054.

Alberti, Corinne; Brun-Buisson, Christian; Goodman, Sergey V.; Guidici, Daniela; Granton, John; Moreno, Rui et al. (2003): Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. In: *Am J Respir Crit Care Med* 168 (1), S. 77–84.

Alexander, C.; Rietschel, E. T. (2001): Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. In: *J Endotoxin Res* 7 (3), S. 167–202.

Andersson, Ulf; Tracey, Kevin J. (2012): Reflex Principles of Immunological Homeostasis. In: *Annu. Rev. Immunol.* 30 (1), S. 313–335.

Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. In: *Crit Care Med* 29 (7), S. 1303–1310.

Angus, D. C.; Wax, R. S. (2001): Epidemiology of sepsis: an update. In: *Crit Care Med* 29, S. S109-16.

Angus, Derek C.; van der Poll, Tom (2013): Severe Sepsis and Septic Shock. In: *N Engl J Med* 369 (9), S. 840–851.

Ausschuss für Anästhesiologie (2001): Operative Eingriffe bei Versuchstieren. Hg. v. GV SOLAS.

Ayala, C. A. (1995): Stimulation of choline acetyl transferase activity by l- and d-carnitine in brain areas of neonate rats. In: *J Neurosci Res* 41 (3), S. 403–408.

Baan, J.; van der Velde, E. T.; Bruin, H. G. de; Smeenk, G. J.; Koops, J.; van Dijk, A. D. et al. (1984): Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. In: *Circulation* 70 (5), S. 812–823.

Baechtold, François; Cavadas, Claudia; Gasser, Didier; Markert, Michèle et al. (2001): Cardiovascular effects of fentanyl in conscious rats. In: *Pflügers Arch* 443 (1), S. 155–162.

Beekwilder, J. P.; Beems, T. (2010): Overview of the clinical applications of vagus nerve stimulation. In: *J Clin Neurophysiol* 27 (2), S. 130–138.

Belikoff, Bryan; Buras, Jon A. (2008): Sourcebook of models for biomedical research. A Practical Approach to Animal Models of Sepsis. Conn. Totowa, N.J: Humana Press.

Bellinger, D. L.; Lorton, D.; Hamill, R. W.; Felten, S. Y.; Felten, D. L. (1993): Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation. In: *Brain Behav Immun* 7 (3), S. 191–204.

Bencsics, Agnes; Elenkov, Ilia J.; Vizi, E.Sylvester (1997): Effect of morphine on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production in vivo: involvement of the sympathetic nervous system. In: *Journal of Neuroimmunology* 73 (1-2), S. 1–6.

Bernik, Thomas R.; Friedman, Steven G.; Ochani, Mahendar; DiRaimo, Robert; Ulloa, Luis; Yang, Huan et al. (2002): Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. In: *J Exp Med* 195 (6), S. 781–788.

Blalock, J. E. (2005): The immune system as the sixth sense. In: *J Intern Med* 257 (2), S. 126–138.

Bonaz, B.; Picq, C.; Sinniger, V.; Mayol, J. F.; Clarençon, D. (2013): Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. In: *Neurogastroenterology & Motility* 25 (3), S. 208–221.

Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A. et al. (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. In: *Chest* 101 (6), S. 1644–1655.

Boomer, Jonathan S. (2011): Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. In: *JAMA* 306 (23), S. 2594.

Boomer, Jonathan S.; Shuherk-Shaffer, Jennifer; Hotchkiss, Richard S.; Green, Jonathan M. (2012): A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. In: *Crit Care* 16 (3), S. R112.

Boost, Kim A.; Leipold, Tobias; Scheiermann, Patrick; Hoegl, Sandra; Sadik, Christian D.; Hofstetter, Christian; Zwissler, Bernhard (2009): Sevoflurane and isoflurane decrease TNF-alpha-induced gene expression in human monocytic THP-1 cells: potential role of intracellular IkappaBalpha regulation. In: *Int J Mol Med* 23 (5), S. 665–671.

Borovikova, L. V.; Ivanova, S.; Nardi, D.; Zhang, M.; Yang, H.; Ombrellino, M.; Tracey, K. J. (2000a): Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. In: *Auton Neurosci* 85 (1-3), S. 141–147.

Borovikova, L. V.; Ivanova, S.; Zhang, M.; Yang, H.; Botchkina, G. I.; Watkins, L. R. et al. (2000b): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. In: *Nature* 405 (6785), S. 458–462.

Bouhemad, Bélaïd; Nicolas-Robin, Armelle; Arbelot, Charlotte; Arthaud, Martine; Féger, Frédéric; Rouby, Jean-Jacques (2009): Acute left ventricular dilatation and shock-induced myocardial dysfunction*. In: *Critical Care Medicine* 37 (2), S. 441–447.

Boyd, John H.; Mathur, Sumeet; Wang, Yingjin; Bateman, Ryon M.; Walley, Keith R. (2006): Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. In: *Cardiovasc Res* 72 (3), S. 384–393.

Bratton, B. O.; Martelli, D.; McKinley, M. J.; Trevaks, D.; Anderson, C. R.; McAllen, R. M. (2012): Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. In: *Exp Physiol* 97 (11), S. 1180–1185.

Brunkhorst, F. M. (2006): Epidemiology, Economy and Practice - Results of the German Study on Prevalence by the Competence Network Sepsis (SepNet). In: *Anesthesiol Intensivmed Notfal* 41 (01), S. 43–44.

Buras, Jon A.; Holzmann, Bernhard; Sitkovsky, Michail (2005): Animal models of sepsis: setting the stage. In: *Nat Rev Drug Discov* 4 (10), S. 854–865.

Cain, B. S.; Meldrum, D. R.; Dinarello, C. A.; Meng, X.; Joo, K. S.; Banerjee, A.; Harken, A. H. (1999): Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. In: *Crit Care Med* 27 (7), S. 1309–1318.

Celes, Mara R. N.; Malvestio, Lygia M.; Suadicani, Sylvia O.; Prado, Cibele M.; Figueiredo, Maria J.; Campos, Erica C. et al. (2013): Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlies Cardiac Structural and Functional Changes in Severe Sepsis. In: *PLoS ONE* 8 (7), S. e68809.

Chang, Elmer Y.; Guo, Beichu; Doyle, Sean E.; Cheng, Genhong (2007): Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. In: *J Immunol* 178 (11), S. 6705–6709.

Chong, Deborah L. W.; Sriskandan, Shiranee (2011): Pro-inflammatory mechanisms in sepsis. In: *Contrib Microbiol* 17, S. 86–107.

Czura, C. J.; Tracey, K. J. (2005): Autonomic neural regulation of immunity. In: *J Intern Med* 257 (2), S. 156–166.

Dani, John A.; Balfour, David J. K. (2011): Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. In: *Trends Neurosci*.

Darvesh, Sultan; Hopkins, David A.; Geula, Changiz (2003): Neurobiology of butyrylcholinesterase. In: *Nat Rev Neurosci* 4 (2), S. 131–138.

Dinarello, C. A. (1997): Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. In: *Chest* 112 (6 Suppl), S. 321S-329S.

Duncan, David J.; Yang, Zhaokang; Hopkins, Philip M.; Steele, Derek S.; Harrison, Simon M. (2010): TNF-alpha and IL-1beta increase Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. In: *Cell Calcium* 47 (4), S. 378–386.

Dvorakova, Magdalena; Lips, Katrin S.; Brüggmann, Dörthe; Slavikova, Jana; Kuncova, Jitka; Kummer, Wolfgang (2005): Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. In: *Cell Tissue Res* 319 (2), S. 201–209.

Ebelt, H.; Werdan, K. (2010): Sepsis und Herz. In: *Internist* 51 (7), S. 844–849.

Ebelt, Henning; Müller-Werdan, Ursula; Werdan, Karl (2011): Septische Kardiomyopathie. In: *Intensivmed.up2date* 7 (02), S. 121–133.

Eger, E. I. (1981): Isoflurane: a review. In: *Anesthesiology*; 55: 559-576 (55), S. 559–576.

Elliott, Perry; Andersson, Bert; Arbustini, Eloisa; Bilinska, Zofia; Cecchi, Franco; Charron, Philippe et al. (2008): Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. In: *Eur Heart J* 29 (2), S. 270–276.

Elst, K. M. ver; Spapen, H. D.; Nguyen, D. N.; Garbar, C.; Huyghens, L. P.; Gorus, F. K. (2000): Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. In: *Clin Chem* 46 (5), S. 650–657.

Engel, Christoph; Brunkhorst, Frank M.; Bone, Hans-Georg; Brunkhorst, Reinhard; Gerlach, Herwig; Grond, Stefan et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. In: *Intensive Care Med* 33 (4), S. 606–618.

Erhardt, W.; Henke, J.; Lendl, C. (2002): Narkose-Notfälle: Enke.

Flondor, M.; Hofstetter, C.; Boost, K. A.; Betz, C.; Homann, M.; Zwissler, B. (2008): Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response. In: *Eur Surg Res* 40 (1), S. 1–6.

Fodale, Vincenzo; Santamaria, Letterio B. (2008): Cholinesterase inhibitors improve survival in experimental sepsis: A new way to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway*. In: *Critical Care Medicine* 36 (2), S. 622–623.

Garner, Leslie B.; Willis, Monte S.; Carlson, Deborah L.; DiMaio, J. Michael; White, Michael D.; White, D. Jean et al. (2003): Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (6), S. H2500-9.

Georgakopoulos, D.; Mitzner, W. A.; Chen, C. H.; Byrne, B. J.; Millar, H. D.; Hare, J. M.; Kass, D. A. (1998): In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. In: *Am J Physiol* 274 (4 Pt 2), S. H1416-22.

Godin, P. J.; Fleisher, L. A.; Eidsath, A.; Vandivier, R. W.; Preas, H. L.; Banks, S. M. et al. (1996): Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial. In: *Crit Care Med* 24 (7), S. 1117–1124.

Grandel, U.; Fink, L.; Blum, A.; Heep, M.; Buerke, M.; Kraemer, H. J. et al. (2000): Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. In: *Circulation* 102 (22), S. 2758–2764.

Hochstadt, Aviram; Meroz, Yuval; Landesberg, Giora (2011): Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: More Questions Than Answers? In: *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 25 (3), S. 526–535.

Hofer, Stefan; Eisenbach, Christoph; Lukic, Ivan K.; Schneider, Lutz; Bode, Konrad; Brueckmann, Martina et al. (2008): Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis*. In: *Critical Care Medicine* 36 (2), S. 404–408.

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (16), S. 7276–7280.

Hosenpud, J. D.; Campbell, S. M.; Mendelson, D. J. (1989): Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. In: *J Heart Transplant* 8 (6), S. 460–464.

Hotchkiss, Richard S.; Karl, Irene E. (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. In: *N Engl J Med* 348 (2), S. 138–150.

Hotchkiss, Richard S.; Monneret, Guillaume; Payen, Didier (2013): Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. In: *The Lancet Infectious Diseases* 13 (3), S. 260–268.

Huston, Jared M.; Ochani, Mahendar; Rosas-Ballina, Mauricio; Liao, Hong; Ochani, Kanta; Pavlov, Valentin A. et al. (2006): Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. In: *J Exp Med* 203 (7), S. 1623–1628.

Johnston, T. D.; Hampton, W. W.; Fry, D. E. (1989): Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. In: *Curr Surg* 46 (2), S. 101–103.

Kakinuma, Yoshihiko; Akiyama, Tsuyoshi; Sato, Takayuki (2009): Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. In: *FEBS Journal* 276 (18), S. 5111–5125.

Kapadia, S.; Lee, J.; Torre-Amione, G.; Birdsall, H. H.; Ma, T. S.; Mann, D. L. (1995): Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. In: *J Clin Invest* 96 (2), S. 1042–1052.

Kawashima, Koichiro; Fujii, Takeshi (2008): Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. In: *J Pharmacol Sci* 106 (2), S. 167–173.

Kessler, Wolfram; Diedrich, Stephan; Menges, Pia; Ebker, Tobias; Nielson, Michael; Partecke, Lars Ivo et al. (2012): The Role of the Vagus Nerve: Modulation of the Inflammatory Reaction in Murine Polymicrobial Sepsis. In: *Mediators of Inflammation* 2012, S. 1–9.

Koch, Walter H. (2004): Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. In: *Nat Rev Drug Discov* 3 (9), S. 749–761.

Köhler Chemie GmbH (2011): Gebrauchs- und Fachinformation Anticholium Injektionslösung. Hg. v. Dr. F. Köhler Chemie GmbH.

Krukemeyer, Manfred G. (2005): Chirurgische Forschung. Stuttgart: Thieme.

Kumar, A.; Thota, V.; Dee, L.; Olson, J.; Uretz, E.; Parrillo, J. E. (1996): Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. In: *J Exp Med* 183 (3), S. 949–958.

Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochem Cell Biol* 130 (2), S. 219–234.

Larsen, R. (2012): Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie. 8. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Levy, Mitchell M.; Fink, Mitchell P.; Marshall, John C.; Abraham, Edward; Angus, Derek; Cook, Deborah et al. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Crit Care Med* 31 (4), S. 1250–1256.

Levy, Richard J.; Piel, David A.; Acton, Paul D.; Zhou, Rong; Ferrari, Victor A.; Karp, Joel S.; Deutschman, Clifford S. (2005): Evidence of myocardial hibernation in the septic heart*. In: *Critical Care Medicine* 33 (12), S. 2752–2756.

Lips, Katrin S.; Luhrmann, Anke; Tschernig, Thomas; Stoeger, Tobias; Alessandrini, Francesca; Grau, Veronika et al. (2007): Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. In: *Life Sci* 80 (24-25), S. 2263–2269.

Liu, Demeral D.; Hsu, Yung Hsiang; Chen, Hsing I. (2007): Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (1-2), S. 61–69.

Loewi, O. (1924): Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. In: *Pflugers Arch* 189, S. 239–242.

Lund, D. D.; Davey, G. A.; Subiet, A. R.; Pardini, B. J. (1992): Compensatory recovery of parasympathetic control of heart rate after unilateral vagotomy in rabbits. In: *Am J Physiol* (262).

Lund, D. D.; Schmid, P. G.; Roskoski, R. (1979): Choline acetyltransferase activity in rat and guinea pig heart following vagotomy. In: *Am J Physiol* 236 (4), S. H620-3.

Maass, David L.; White, Jean; Horton, Jureta W. (2002): IL-1beta and IL-6 act synergistically with TNF-alpha to alter cardiac contractile function after burn trauma. In: *Shock* 18 (4), S. 360–366.

Maier, S. F.; Goehler, L. E.; Fleshner, M.; Watkins, L. R. (1998): The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. In: *Ann N Y Acad Sci* 840, S. 289–300.

Mannick, J. A.; Rodrick, M. L.; Lederer, J. A. (2001): The immunologic response to injury. In: *J Am Coll Surg* 193 (3), S. 237–244.

Markel, Troy A.; Crisostomo, Paul R.; Wang, Meijing; Herrmann, Jeremy L.; Abarbanell, Aaron M.; Meldrum, Daniel R. (2007): Right ventricular TNF resistance during endotoxemia: the differential effects on ventricular function. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 (5), S. R1893-7.

Massion, P. B.; Feron, O.; Dessy, C.; Balligand, J-L (2003): Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. In: *Circ Res* 93 (5), S. 388–398.

Matteoli, G.; Gomez-Pinilla, P. J.; Nemethova, A.; Di Giovangiulio, M.; Cailotto, C.; van Bree, S. H. et al. (2014): A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. In: *Gut* 63 (6), S. 938–948.

Meldrum, D. R. (1998): Tumor necrosis factor in the heart. In: *Am J Physiol* 274 (3 Pt 2), S. R577-95.

Mihaylova, Stanka; Killian, Anke; Mayer, Konstantin; Pullamsetti, Soni Savai; Schermuly, Ralph; Rosengarten, Bernhard (2012): Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxinemic rats. In: *J Neuroinflammation* 9 (1), S. 183.

Moerer, O.; Quintel, M. (2009): Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen. In: *Internist* 50 (7), S. 788–798.

Müller-Werdan, Ursula; Buerke, Michael; Christoph, Arnd; Herklotz, Anja; Schlitt, Axel; Heinroth, Konstantin et al. (2007): Septische Kardiomyopathie. In: *Kardio up* 3 (2), S. 107–110.

Nduka, O. Okorie; Parrillo, Joseph E. (2011): The Pathophysiology of Septic Shock. In: *Critical Care Nursing Clinics of North America* 23 (1), S. 41–66.

Nemoto, Shintaro; Vallejo, Jesus G.; Knuefermann, Pascal; Misra, Arunima; Defreitas, Gilberto; Carabello, Blase A.; Mann, Douglas L. (2002): Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282 (6), S. H2316-23.

Olivo, Giuseppe; Consales, Guglielmo; Michelagnoli, Giuliano (2006): Sepsis associated cardiomyopathy. In: *Current Anaesthesia & Critical Care* 17 (6), S. 349–358.

Pacher, Pál; Nagayama, Takahiro; Mukhopadhyay, Partha; Bátkai, Sándor; Kass, David A. (2008): Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. In: *Nat Protoc* 3 (9), S. 1422–1434.

Park, Beom Seok; Song, Dong Hyun; Kim, Ho Min; Choi, Byong-Seok; Lee, Hayyoung; Lee, Jie-Oh (2009): The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. In: *Nature* 458 (7242), S. 1191–1195.

Parker, M. M.; Shelhamer, J. H.; Bacharach, S. L.; Green, M. V.; Natanson, C.; Frederick, T. M. et al. (1984): Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. In: *Ann Intern Med* 100 (4), S. 483–490.

Parrillo, J. E. (1989): The cardiovascular pathophysiology of sepsis. In: *Annu Rev Med* 40, S. 469–485.

Pavlov, Valentin A.; Ochani, Mahendar; Gallowitsch-Puerta, Margot; Ochani, Kanta; Huston, Jared M.; Czura, Christopher J. et al. (2006): Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (13), S. 5219–5223.

Pavlov, Valentin A.; Ochani, Mahendar; Yang, Li-Hong; Gallowitsch-Puerta, Margot; Ochani, Kanta; Lin, Xinchun et al. (2007): Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. In: *Crit Care Med* 35 (4), S. 1139–1144.

Picq, Chloé A.; Clarençon, Didier; Sinniger, Valérie E.; Bonaz, Bruno L.; Mayol, Jean-François S.; Jacobs, Roland (2013): Impact of Anesthetics on Immune Functions in a Rat Model of Vagus Nerve Stimulation. In: *PLoS ONE* 8 (6), S. e67086.

Poli-de-Figueiredo, Luiz F.; Garrido, Alejandra G.; Nakagawa, Naomi; Sannomiya, Paulina (2008): Experimental models of sepsis and their clinical relevance. In: *Shock* 30, S. 53–59.

Rana, Obaida R.; Schauerte, Patrick; Kluttig, Rahel; Schröder, Jörg W.; Koenen, Rory R.; Weber, Christian et al. (2010): Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. In: *Autonomic Neuroscience* 156 (1-2), S. 82–89.

Rittirsch, Daniel; Huber-Lang, Markus S.; Flierl, Michael A.; Ward, Peter A. (2008): Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. In: *Nat Protoc* 4 (1), S. 31–36.

Rocha-Resende, Cibele; Roy, Ashbeel; Resende, Rodrigo; Ladeira, Marina S.; Lara, Aline; Morais Gomes, Enéas Ricardo de et al. (2012): Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 53 (2), S. 206–216.

Rosas-Ballina, M.; Ochani, M.; Parrish, W. R.; Ochani, K.; Harris, Y. T.; Huston, J. M. et al. (2008): Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (31), S. 11008–11013.

Rosas-Ballina, M.; Olofsson, P. S.; Ochani, M.; Valdes-Ferrer, S. I.; Levine, Y. A.; Reardon, C. et al. (2011): Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. In: *Science* 334 (6052), S. 98–101.

Roy, Ashbeel; Fields, William C.; Rocha-Resende, Cibele; Resende, Rodrigo R.; Guatimosim, Silvia; Prado, Vania F. et al. (2013): Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. In: *FASEB J* 27 (12), S. 5072–5082.

Rudiger, Alain (2010): Beta-block the septic heart. In: *Critical Care Medicine* 38, S. S608.

Rudiger, Alain; Singer, Mervyn (2007): Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. In: *Crit Care Med* 35 (6), S. 1599–1608.

Salomao, Reinaldo; Brunialti, Milena Karina Colo; Rapozo, Marjorie Marini; Baggio-Zappia, Giovana Lotici; Galanos, Chris; Freudenberg, Marina (2012): Bacterial Sensing, Cell Signaling, and Modulation of the Immune Response During Sepsis. In: *Shock* 38 (3), S. 227–242.

Schmidt, H.; Flieger, R. R.; Hennen, R.; Tymiec, P.; Winkler, M.; Hoyer, D. et al. (2005a): Reversible autonomic dysfunction in a young woman with septic multiple organ dysfunction syndrome. In: *Dtsch Med Wochenschr* 130 (12), S. 648–651.

Schmidt, Hendrik; Müller-Werdan, Ursula; Hoffmann, Thomas; Francis, Darrel P.; Piepoli, Massimo F.; Rauchhaus, Mathias et al. (2005b): Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. In: *Crit Care Med* 33 (9), S. 1994–2002.

Schmidt, Hendrik; Saworski, Jana; Werdan, Karl; Müller-Werdan, Ursula (2007): Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. In: *J Endotoxin Res* 13 (6), S. 339–342.

Schottmüller, Hugo (1914): Wesen und Behandlung der Sepsis. In: *Verhandlungen des 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin* (Band 31), S. 257–280.

Schouten, Marcel; Wiersinga, Willem Joost; Levi, Marcel; van der Poll, Tom (2008): Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. In: *J Leukoc Biol* 83 (3), S. 536–545.

Sharp, P.E; Regina, M.C.L (1998): *The Laboratory Rat*: Taylor & Francis.

Singh, Suveer; Evans, Timothy W. (2006): Organ dysfunction during sepsis. In: *Intensive Care Med* 32 (3), S. 349–360.

Slavikova J.; Tucek, S. (1982): Choline acetyltransferase in the heart of adult rats. In: *Pflugers Arch* 392 (3), S. 225–229.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1), S. 76–85.

Steendijk, P.; Staal, E.; Jukema, J. W.; Baan, J. (2001): Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (2), S. H755-63.

Stevens, W. C.; Cromwell, T. H.; Halsey, M. J.; Eger, E. I. 2nd; Shakespeare, T. F.; Bahlman, S. H. (1971): The cardiovascular effects of a new inhalation anesthetic, Forane, in human volunteers at constant arterial carbon dioxide tension. In: *Anesthesiology* 35 (1), S. 8–16.

Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820.

Tansey, E. M. (1991): Chemical neurotransmission in the autonomic nervous system: Sir Henry Dale and acetylcholine. In: *Clin Auton Res* 1 (1), S. 63–72.

Tracey, K. J.; Fong, Y.; Hesse, D. G.; Manogue, K. R.; Lee, A. T.; Kuo, G. C. et al. (1987): Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. In: *Nature* 330 (6149), S. 662–664.

Tracey, Kevin J. (2002): The inflammatory reflex. In: *Nature* 420 (6917), S. 853–859.

Tracey, Kevin J. (2007): Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. In: *J. Clin. Invest.* 117 (2), S. 289–296.

Tucek, S. (1982): The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. In: *J Physiol* 322, S. 53–69.

Vaseghi, Marmar; Shivkumar, Kalyanam (2008): The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. In: *Prog Cardiovasc Dis* 50 (6), S. 404–419.

Vincent, Jean-Louis; Rello, Jordi; Marshall, John; Silva, Eliezer; Anzueto, Antonio; Martin, Claude D. et al. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. In: *JAMA* 302 (21), S. 2323–2329.

Vivien, B.; Hanouz, J. L.; Gueugniaud, P. Y.; Lecarpentier, Y.; Coriat, P.; Riou, B. (1997): Myocardial effects of halothane and isoflurane in hamsters with hypertrophic cardiomyopathy. In: *Anesthesiology* 87 (6), S. 1406–1416.

Wang, Hong; Liao, Hong; Ochani, Mahendar; Justiniani, Marilou; Lin, Xinchun; Yang, Lihong et al. (2004): Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. In: *Nat Med* 10 (11), S. 1216–1221.

Wang, Hong; Yu, Man; Ochani, Mahendar; Amella, Carol Ann; Tanovic, Mahira; Susarla, Seenu et al. (2003): Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. In: *Nature* 421 (6921), S. 384–388.

Watkins, L. R.; Goehler, L. E.; Relton, J. K.; Tartaglia, N.; Silbert, L.; Martin, D.; Maier, S. F. (1995): Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. In: *Neurosci Lett* 183 (1-2), S. 27–31.

Weigand, M.A; Bardenheuer, H.J; Böttiger, B.W (2003): Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. In: *Der Anaesthesist* 52 (1), S. 3–22.

Weigand, Markus A.; Hörner, Christian; Bardenheuer, Hubert J.; Bouchon, Axel (2004): The systemic inflammatory response syndrome. In: *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 18 (3), S. 455–475.

Werdan, K. (1989): Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. Darmstadt: Steinkopff (Bd. 26, Suppl. 1).

Werdan, Karl; Schmidt, Hendrik; Ebel, Henning; Zorn-Paul, Klaus; Koidl, Bernd; Hoke, Robert Sebastian et al. (2009): Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. In: *Can J Physiol Pharmacol* 87 (4), S. 266–274.

Wessler, I.; Roth, E.; Deutsch, C.; Brockerhoff, P.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Kilbinger, H. (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. In: *Br J Pharmacol* 134 (5), S. 951–956.

Wherry, E. John (2011): T cell exhaustion. In: *Nat Immunol* 131 (6), S. 492–499.

Wichterman, K. A.; Baue, A. E.; Chaudry, I. H. (1980): Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. In: *J Surg Res* 29 (2), S. 189–201.

Zorn-Pauly, Klaus; Pelzmann, Brigitte; Lang, Petra; Machler, Heinrich; Schmidt, Hendrik; Ebel, Henning et al. (2007): Endotoxin impairs the human pacemaker current *I_f*. In: *Shock* 28 (6), S. 655–661.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats

Schulte, Astrid; Lichtenstern, Christoph; Henrich, Michael; Weigand, Markus A.; Uhle, Florian (2014): Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. In: *Journal of Surgical Research* DOI: 10.1016/j.jss.2014.01.022.

Effects of echinocandin preparations on adult ventricular cardiomyocytes: Preliminary results of an in vitro study

Arens, C.; Uhle, F.; Wolff, M.; Rohrig, R.; Koch, C.; Schulte, A. et al. (2014): Effects of echinocandin preparations on adult rat ventricular cardiomyocytes: Preliminary results of an in vitro study. In: *Anaesthesist* 63 (2), S. 129–134.

Veröffentlichte Kongressbeiträge (Poster)

Schulte, A.; Uhle, F.; Henrich, M.; Lichtenstern, C.; Weigand, M.A (2013): Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. In: *Autonomic Neuroscience* 177 (1), S. 61.

ISAN-EFAS International Conference Giessen, 2013

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all jenen bedanken, die direkt oder indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen und mich auf verschiedenste Weise dabei unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Weigand für die Überlassung des Themas dieser Arbeit in seiner Abteilung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meinem Laborleiter und ehemaligem Kommilitonen Florian Uhle für die Betreuung und Unterstützung in wissenschaftlichen Dingen. Herzlichen Dank auch an Dr. med. Christoph Lichtenstern für die Durchsicht dieser Arbeit.

Weiter möchte ich Ilona ein besonderes Dankeschön sagen, nicht nur für Ihre große Unterstützung während der Versuche im Labor, sondern auch für das Zuhören, die Versorgung mit Lebens- und Genussmitteln jeglicher Art ☺ und die Beratung in allen Lebens- und „Not“-lagen. Vielen, vielen Dank!

Auch bei den lieben „Nachbarn“, aktuell Katrin, Sigrid, Laetitia, Gabi, Marion und natürlich Frau Prof. Dr. Grau sowie bei den bereits nicht mehr dort ansässigen Ex-Doktorandinnen Jessica und Alena möchte ich mich für die fachlichen Ratschläge und netten und lustigen Gespräche bedanken! Jessi: Danke, dass ich dich immer noch anrufen darf ☺.

Meiner „Kollegin der ersten Stunde“ Julia gilt Dank für ihre gute Einarbeitung und ihren sonstigen „Beistand“. Irgendwann werden wir beide darüber lachen...☺!

Außerdem muss ein ganz herzlicher Dank an meine Eltern und den Rest der Familie gerichtet werden, die mich während der ganzen Zeit moralisch unterstützt haben und ohne die Vieles nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank!

Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.